

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA 



TESIS DOCTORAL

Papel de los cambios morfológicos en la virulencia de *Cryptococcus neoformans*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rocío García Rodas

Director

Óscar Zaragoza Hernández

Madrid, 2014

Índice

Abreviaturas	7
Resumen.....	11
Introducción.....	23
1.- Importancia de las infecciones fúngicas	25
2.- Criptococosis y <i>Cryptococcus</i>	25
2.1.- <i>Cryptococcus neoformans</i>	26
2.2.- <i>Cryptococcus gattii</i>	26
3.- Nomenclatura y clasificación de <i>Cryptococcus</i>	27
4.- Interacción con el huésped	28
4.1.- Respuesta inmune durante la criptococosis	28
4.2.- Interacción con células fagocíticas: Fagocitosis y parasitismo intracelular	29
4.3.- Diseminación al sistema nervioso central (SNC).....	32
4.4.- Latencia y reactivación.....	32
5.- <i>Cryptococcus</i> como patógeno ambiental	33
6.- Factores de virulencia	33
6.1.- Melanina	33
6.2.- Crecimiento a 37°C, ureasa y fosfolipasas	34
6.3.- Cápsula.....	34
7.- Morfogénesis	36
7.1.- Cambios en la estructura de la cápsula.....	37
7.2.- Cambios de tamaño de la cápsula.....	37
7.3.- Cambios en el tamaño total de la célula	38
8.- Interés de <i>Cryptococcus</i> como modelo de patogénesis fúngica	39
Objetivos.....	41
Material y métodos.....	45
1.- Cepas y condiciones de crecimiento de levaduras.....	47
1.1.- Cepas de <i>Cryptococcus</i>	47
1.2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	47
2.- Inhibidores de ciclo celular	49
3.- Técnicas microbiológicas	49

3.1.- Curvas de crecimiento.....	49
3.2.- Patrón de crecimiento en medios sólidos	49
3.3.- Cuantificación de la actividad lacasa	49
3.4.- Análisis del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.....	50
3.5.- Tinciones	50
4.- Técnicas de citometría de flujo	53
4.1.- Análisis del contenido en ADN.....	53
4.2.- Análisis de la viabilidad de las células.....	53
5.- Modelos de interacción con el huésped.....	54
5.1.- Cultivos celulares	54
5.2.- Modelo de ratón.....	56
5.3.- Modelo de <i>Galleria mellonella</i>	57
6.- Microscopía	60
6.1.- Microscopía de campo claro y epifluorescencia.....	60
6.2.- Microscopía confocal.....	60
6.3.- Microscopía electrónica de barrido	60
6.4.- Microscopia en tiempo real	60
7.- Técnicas de biología molecular.....	61
7.1.- Obtención y cuantificación de ADN genómico de <i>Cryptococcus</i>	61
7.2.- Diseño de los cebadores.....	61
7.3.- Construcción de ADN recombinante mediante PCR de fusión.....	62
7.4.- Transformación biolística	63
7.5.- Comprobación de la incorporación del ADN de fusión.....	65
8.- Técnicas de proteómica	66
8.1.- Preparación y cuantificación de extractos de proteínas.....	66
8.2.- Geles DIGE y análisis	66
9.- Técnicas bioinformáticas.....	67
9.1.- Identificación de genes que codifican posibles ciclinas de G1/S de <i>Cryptococcus</i> por homología de secuencia con <i>Cln1</i> de <i>Ustilago maydis</i>	67
9.2.- Identificación de genes únicos en <i>Cryptococcus neoformans</i> y genes con origen filogenético común a genes CAP	68
10.- Estadística	68

Resultados.....	71
Sección I: Incremento de la cápsula en <i>Cryptococcus neoformans</i>	73
1.- Estudio del incremento capsular utilizando el modelo animal de <i>Galleria mellonella</i>	73
1.1.- Interacción del huésped invertebrado <i>Galleria mellonella</i> con <i>Cryptococcus neoformans</i>	73
1.2.- Morfogénesis de <i>Cryptococcus neoformans</i> durante la infección de <i>Galleria mellonella</i>	75
1.3.- Efecto del crecimiento capsular en la fagocitosis	76
1.4.- Influencia de la temperatura en la morfogénesis de <i>C. neoformans</i> en <i>G. mellonella</i>	77
1.5.- Cambios en la estructura de la cápsula durante la infección en <i>G. mellonella</i>	79
1.6.- Identificación de elementos de <i>G. mellonella</i> que inducen el crecimiento capsular.....	80
2.- Identificación de elementos involucrados en el crecimiento capsular.....	82
2.1.- Abordaje genómico para identificar genes involucrados en la síntesis y/o crecimiento de la cápsula.....	82
2.2.- Caracterización <i>in vitro</i> de los mutantes seleccionados.....	84
2.3.- Caracterización <i>in vivo</i> de los mutantes seleccionados	86
3.- Relación entre el crecimiento capsular y el ciclo celular en <i>Cryptococcus neoformans</i>	89
3.1.- Análisis del contenido en ADN de <i>C. neoformans</i> durante el crecimiento capsular.....	89
3.2.- Estudio del crecimiento capsular en presencia de inhibidores del ciclo celular	90
3.3.- Visualización del crecimiento capsular mediante microscopía en tiempo real.....	92
3.4.- Identificación de una ciclina G1/S en <i>C. neoformans</i>	93
3.5.- Anotación de <i>Cln1</i> de <i>C. neoformans</i>	94
3.6.- Análisis de la longitud de la fase G1 del ciclo celular mediante microscopía en tiempo real.....	96
3.7.- Características del crecimiento de la cepa mutante <i>cln1</i>	96
3.8.- Caracterización del crecimiento capsular <i>in vitro</i> del mutante de ciclina.....	98
3.9.- Características morfológicas de la cepa mutante de ciclina	98
3.10.- Análisis del perfil de proteínas diferencialmente acumuladas en el mutante <i>cln1</i> durante el crecimiento capsular.....	101
3.11.- Virulencia y variaciones del tamaño de la cápsula del mutante <i>cln1</i> durante la infección de <i>G. mellonella</i>	103
3.12.- Producción de melanina y cuantificación de la actividad lacasa de la cepa mutante <i>cln1</i>	104

3.13.- Sensibilidad de la cepa mutante <i>cln1</i> al estrés oxidativo producido por el peróxido de hidrógeno	106
3.14.- Producción de melanina en presencia de inhibidores del ciclo celular.....	106
3.15.- Curvas de crecimiento en medio L-DOPA en presencia de inhibidores del ciclo celular.....	107
3.16.- Análisis de la virulencia de las células melanizadas en <i>G. mellonella</i>	108
Sección II: Formación de células gigantes.....	109
1.- Formación de células gigantes/titanes de <i>C. neoformans</i> durante la infección.....	109
1.1.- Formación y caracterización de células gigantes de <i>Cryptococcus neoformans</i> durante la infección en ratón	109
1.2.- Caracterización fenotípica de las células gigantes recuperadas de ratón.....	110
1.3.- <i>Cryptococcus neoformans</i> forma células gigantes durante la infección de <i>G. mellonella</i> ...	114
1.4.- Estudio de la morfogénesis de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> durante la infección de ratones	115
1.5.- Estudio de la morfogénesis de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> durante la infección de <i>G. mellonella</i>	117
2.- Células gigantes/titanes y su papel en virulencia	119
2.1.- Estudio de la virulencia de las células gigante en el modelo de <i>G. mellonella</i>	119
2.2.- Interacción de las células gigantes con el sistema inmune.....	120
2.3.- Patrón de citoquinas producido por macrófagos peritoneales tras la infección con células de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	121
Discusión.....	123
Sección I: Incremento de la cápsula en <i>Cryptococcus neoformans</i>.....	125
1.- Estudio del incremento capsular utilizando el modelo animal de <i>Galleria mellonella</i>	125
2.- Identificación de mecanismos moleculares que regulan el crecimiento capsular	128
2.1.- Abordaje genómico para la identificación de genes involucrados en la cápsula.....	128
2.2.- Relación del ciclo celular y el crecimiento de la cápsula.....	130
Sección II: Formación de células gigantes.....	135
Conclusiones	141
Anexos.....	145
Anexo 1	147
Anexo 2	149
Anexo 3	151
Bibliografía.....	213

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Eragment Lenght Polymorphism*)

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*)

BHE: Barrera hematoencefálica

BSA: Albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

Cdk: Ciclina dependiente de quinasa (*Cyclin Dependent Kinase*)

C.g: Cryptococcus gattii

C.n: Cryptococcus neoformans

CO₂: Dióxido de carbono

d: días

D.O: Densidad óptica

D.I.C: Microscopía de contraste interdiferecial (*Differential Interferent Contrast microscopy*)

DIGE: Electroforesis diferencial en gel (*Difference Gel Electrophoresis*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPS: Deoxirribonucleotidos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GalXM: galactoxilomanano

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GXM: glucuronoxilomanano

GXMGal: glucuronoxilomananogalactano

h: horas

HAART: Terapia antirretroviral de alta actividad (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-10: interleuquina 10

IL-6: interleuquina 6

IPS: Salino fisiológico para insecto (*Insect Physiological Saline*)

KDa: kilodaltons

L-DOPA: L-3,4- dihidroxifenilalanina

min: minutos

MP: Manoproteínas

mU Abs/min/μg: miliunidades de absorbacia por minuto y microgramo

PAGE: Electroforesis en gel de poliácridamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

psi: libra por pulgada cuadrada (pound per square inch)

RFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Lenght Polymorphism)

r.p.m: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato sódico

Tampón EB: Tampón “elution buffer”

Tampón TE: Tampón Tris-HCl-EDTA

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor- α)

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

WGA: Aglutinina de germen de trigo (Wheat Germ Agglutinin)

Wt: Cepa Silvestre (Wild Type)

YNB: Yeast Nitrogen Base

YPD: Yeast Peptone Dextrose

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Resumen

Role of morphological changes in the virulence of *Cryptococcus neoformans*

Introduction

Cryptococcosis is an infectious disease caused by yeasts from the genus *Cryptococcus*, being *C. neoformans* and *C. gattii* the species more often isolated. *Cryptococcus neoformans* is a cosmopolitan environmental pathogen of major concern among HIV patients which has a significant incidence in developing areas. *Cryptococcus neoformans* blastoconidia or desiccated spores are inhaled and can cause pneumonia and meningitis in immunosuppressed individuals. Its sibling species, *Cryptococcus gattii*, is more restricted to tropical areas and infects principally immunocompetent individuals and causes mainly pneumonia. *Cryptococcus* interaction with the host has been widely studied for its capacity to modulate the immune response, replicate within macrophages, disseminate from the lungs to the central nervous system, and/or stay in a latent state for years. The main cryptococcal virulence factors are a polysaccharide capsule and melanin accumulation, although this yeast has also other traits, such as urease and phospholipases that confer adaptation to the host.

Morphogenesis is a common feature among fungal pathogens. *Cryptococcus neoformans* does not form filaments nor pseudohyphae. However, during infection, this yeast undergoes cellular changes which result in the appearance of different cellular types. These changes are: 1) Capsule enlargement; and 2) Significant growth of the whole cell, which leads to the formation of "Giant/Titan" cells. However, the molecular mechanisms involved in the regulation of these processes are not known.

Objectives

The main objective of this thesis was to investigate the role of morphogenesis (capsule growth and giant cells formation) in *Cryptococcus*. For this purpose, we have used different types of host models. In addition to classical murine models, we have also established the use of *Galleria mellonella* model to investigate cryptococcal morphogenesis. We have also tried to identify genes and the molecular mechanisms that regulate these morphological transitions. In particular, we have pursued the following specific objectives:

- 1.- To use the non vertebrate model *Galleria mellonella* to study *C. neoformans* morphogenesis during infection.
- 2.- To identify possible novel genes involved in capsule biosynthesis or enlargement and the possible relationship between cell cycle progression and this phenomenon.
- 3.- To characterize phenotypically the formation of giant/titan cells in *C. neoformans* and *C. gattii*
- 4.- To study the role and importance of giant cells formation for the host

Results

To study the role of morphogenesis in *Cryptococcus* during infection, we have followed different lines that will be summarized in the following sections:

1.- Capsule enlargement

Cryptococcus neoformans can infect and cause disease to the lepidopteran *Galleria mellonella* in a dose dependent manner. In this infection model, *C. neoformans* produced similar morphological changes to those observed in mice, such as capsule enlargement. The capsule of *C. neoformans* suffered rearrangements during infection in *G. mellonella* and polar lipids from the larvae seemed to play a role in enhancing capsule enlargement.

The molecular mechanisms involved in this process are not known. To identify new genes involved in capsule enlargement, a genomic approach was carried out. In particular, we looked for genes that were unique in *C. neoformans* and (not present in other fungi), because we argue that since the capsule is a unique structure in *Cryptococcus*, there must be genes involved in its synthesis that are only present in this yeast. We also looked for genes which had coevolved with already known capsule genes such as *CAP* genes, since genes that are involved in the same pathway tend to evolve similarly. A total of 33 mutants of the corresponding genes were obtained from an ATCC knock out collection of *Cryptococcus neoformans* available at our laboratory. All mutants selected were able to grow at 37°C and produce melanin in L-DOPA medium. Capsule enlargement defects were found in 14 of them and a correlation with decreased virulence in *G. mellonella* could be established for some of them.

As an alternative approach, we hypothesized that capsule enlargement is regulated by the cell cycle for the following reasons: 1) During capsule growth there is a correlation between capsule size and cell body size, so we believe that factors that regulate the cell body size, which occurs in G1, also regulate capsule size; and 2) we argue that capsule enlargement stops during G2/M because in these phases, the accumulation of new polysaccharide at the capsule might interfere with the emergence and separation of the bud from the mother cells. For these reasons we believe that capsule enlargement occurs mainly in G1 phase of the cycle. Therefore, we investigated capsular phenotypes in a *cln1* mutant and in the reconstituted strain. This mutant lacks a G1/S cyclin, and for this reason, it presents an abnormal elongated G1 phase. Besides, this mutant exhibited enhanced capsule growth, suggesting that factors that elongate G1 phase result in stronger capsule induction. Furthermore, *cln1* mutant was unable to produce melanin and lacked laccase activity, which suggests that cell cycle regulatory proteins play a role in modulating the expression of the main virulence factors in *Cryptococcus*.

2.- Giant cell formation

Cryptococcus neoformans and *C. gattii* were able to form giant cells during infection both in mice and in larvae of *G. mellonella*. Giant cell formation involved not only capsule enlargement but

growth of the whole cell including the cell body. Giant cells were phenotypically different to cells grown *in vitro*. Although macrophages were unable to phagocytose giant cells, these yeasts were recognized and induce cytokine production. Furthermore, we used *G. mellonella* to assess giant cell virulence and found out that they were capable of producing infection and generate a progeny of regular size.

Cryptococcus gattii was more efficient in forming giant cells than *C. neoformans*. Besides, *C. neoformans* and *C. gattii* have developed different strategies to form giant cells during infection in mice. Giant cells from *C. neoformans* involve an increase both in cell body size and in capsule size. In contrast, *C. gattii* giant cells involve no significant increase in cell body size but only an increase in capsule size.

Discussion

1. Capsule enlargement

Our results suggest that morphological changes are a key feature of the virulence of *Cryptococcus*. Capsule enlargement occurs both in *G. mellonella* and in mice, which suggests that *Cryptococcus* has acquired this virulence trait from the interaction with environmental hosts.

Despite *Cryptococcus* capsule has been widely studied due to its capacity to modulate the host immune response, the molecular mechanisms involved in capsule enlargement are not known. Our strategy to identify possible new genes involved in this process gave us a list of candidates which showed capsule enlargement defects and/or reduced virulence in the *G. mellonella* model. However, the mutants of these proteins deserve further studies to investigate their role in capsule enlargement process.

As an alternative approach, we studied capsular phenotypes in cell cycle regulators mutants. We demonstrated that capsule enlargement occurs mainly in G1 phase. Our results indicate that factors that regulate cell size during G1 (i.e. the TOR pathway) are also involved in the regulation of capsule enlargement. Moreover, our findings also suggest that progression through the cell cycle is not only under the control of the cell body size, but also of capsule size in *C. neoformans*.

Besides, *cln1* was unable to produce melanin in L-DOPA medium, which means that this particular cyclin, serves as a regulator of the expression of the two main virulence factors in *C. neoformans*.

2. Giant cell formation

Giant cell formation poses a major problem for the immune system by virtue of its size. Giant cell formation occurs both in *G. mellonella* and mice, which suggests that it contributes to the survival of *Cryptococcus* in different hosts. Giant cells are not phagocytosed by macrophages; however they are recognized and induce the production of cytokines by macrophages, which could lead to an exacerbation of the host response. Besides, giant cell formation is different in *C. neoformans* and *C.*

gattii. In mice, *C. neoformans* forms giant cells by enlarging both cell body and capsule in a proportional way. In contrast, *C. gattii* seems to have developed a strategy to produce giant cells mainly by the addition of new polysaccharide to the capsule, leading to giant cells with a small cell body and a thick capsule of polysaccharide. These differences could explain the differences observed in the epidemiology and the type of disease they cause. We believe that *C. gattii* giant cells must be more difficult to eliminate due to the higher amount of polysaccharide present in the cells, and thus, it can infect immunocompetent host. Besides, the differences observed in the efficiency in forming giant cells between *C. neoformans* and *C. gattii* also correlates with the type of disease suffered. While *C. neoformans* usually disseminates to the central nervous system, the higher efficiency in forming giant cells of *C. gattii* explains why this pathogen causes mainly pneumonia and difficulties the dissemination to other organs.

To summarize, morphogenesis in fungi not only comprises the transition between yeast forms to hyphae. *Cryptococcus* undergoes a complex morphological program during infection, including capsule enlargement and the formation of giant cells, which results in the appearance of multiple types of yeast cells that contribute to immune evasion and persistence in the host. For that reason, we believe that our work significantly contributes to understand the pathogenesis of *Cryptococcus*.

Papel de los cambios morfológicos en la virulencia de *Cryptococcus neoformans*

Introducción

La criptococosis es una enfermedad causada por levaduras del género *Cryptococcus*, siendo *C. neoformans* y *C. gattii* las especies que con mayor frecuencia causan esta enfermedad. *Cryptococcus neoformans* es un patógeno ambiental cosmopolita que afecta principalmente a pacientes VIH y que tiene una incidencia importante en los países en vías de desarrollo. Las blastoconidias o esporas disecadas de *Cryptococcus neoformans* son inhaladas y pueden causar neumonía y meningitis en individuos inmunodeprimidos. *Cryptococcus gattii* está más restringido a áreas tropicales y afecta principalmente a individuos inmunocompetentes, causando neumonía en la mayoría de los casos. La interacción de *Cryptococcus* con el huésped ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para inmunomodular la respuesta inmune, replicarse en el interior de los macrófagos, diseminar desde los pulmones al sistema nervioso central, y/o permanecer en estado latente durante años. Los principales factores de virulencia de *Cryptococcus* son una cápsula de polisacárido y la capacidad para acumular melanina, aunque esta levadura presenta otros rasgos, como la producción de ureasa y fosfolipasas que le confieren ventaja para su supervivencia en el huésped.

La morfogénesis es un rasgo común a muchos hongos patógenos. *Cryptococcus* no forma hifas ni pseudohifas. Sin embargo, durante la infección, esta levadura sufre cambios celulares que resultan en la aparición de diferentes tipos de células. Estos cambios son: 1) Crecimiento de la cápsula; y 2) Crecimiento global de la células, lo que lleva a la formación de células “gigantes o titanes”. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estos procesos no son conocidos.

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis fue investigar el papel de la morfogénesis (crecimiento de la cápsula y formación de células gigantes) en *Cryptococcus*. Para ello, hemos utilizado distintos modelos de huésped. A parte del modelo clásico de huésped de ratón, hemos puesto a punto el uso de *Galleria mellonella* para investigar la morfogénesis de *Cryptococcus*. Hemos tratado también de identificar genes y los mecanismos moleculares que regulan estas transiciones morfológicas. En concreto, hemos perseguido los siguientes objetivos:

- 1.- Usar el modelo no vertebrado *Galleria mellonella* para estudiar la morfogénesis de *C. neoformans* durante la infección.
- 2.- Identificar posibles nuevos genes involucrados en la biosíntesis o en el crecimiento de la cápsula y la posible relación entre la progresión del ciclo celular y este fenómeno

- 3.- Caracterizar fenotípicamente la formación de células gigantes/titanes en *C. neoformans* y en *C. gattii*
- 4.- Estudiar el papel y la importancia de la formación de células gigantes para el huésped.

Resultados

Para estudiar el papel de la morfogénesis de *Cryptococcus* durante la infección, hemos seguido diferentes líneas que se resumirán en las siguientes secciones:

1.- Crecimiento de la cápsula

Cryptococcus neoformans puede infectar y producir enfermedad en el lepidóptero *Galleria mellonella* dependiendo de la dosis. En este modelo, *C. neoformans* sufre cambios morfológicos similares a los observados durante la infección en ratones, como el crecimiento de la cápsula. La cápsula de *C. neoformans* sufre reorganizaciones durante la infección de *G. mellonella* y los lípidos polares presentes en las larvas parecen estar involucrados en la inducción de este crecimiento capsular.

Los mecanismos moleculares involucrados en este proceso no se conocen. Para identificar nuevos genes involucrados en el crecimiento capsular, buscamos genes que fueran únicos en *C. neoformans* (no presentes en otros hongos), ya que pensamos que como la cápsula es una estructura única de *Cryptococcus*, deben existir genes involucrados en su síntesis que estén presentes sólo en esta levadura. También buscamos genes que hubieran co-evolucionado con genes ya conocidos involucrados en la cápsula de *Cryptococcus* como los genes *CAP*, ya que genes involucrados en las mismas rutas suelen evolucionar conjuntamente. Un total de 33 mutantes de los correspondientes genes seleccionados fueron obtenidos de la colección de mutantes de *C. neoformans* de la ATCC disponible en nuestro laboratorio. Todos los mutantes seleccionados fueron capaces de crecer a 37°C y producir melanina en medio L-DOPA. Encontramos defectos en la capacidad para incrementar el tamaño de la cápsula en 14 de ellos, y se pudo establecer una correlación entre defectos en el crecimiento de la cápsula y una virulencia disminuida para algunos de ellos.

Alternativamente, planteamos la hipótesis de que el crecimiento capsular estuviera regulado por el ciclo celular por las siguientes razones: 1) Durante el crecimiento capsular hay una correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular, de modo que creemos que los factores que regulan el crecimiento del cuerpo celular, que ocurre principalmente en G1, también regulan el tamaño de la cápsula; y 2) pensamos que el crecimiento de la cápsula se detiene durante las fases G2/M, ya que en estas fases, la acumulación de nuevo polisacárido podría interferir con el proceso de gemación. Por estas razones, creemos que el crecimiento capsular ocurre principalmente en la fase G1 del ciclo celular. De modo que investigamos fenotipos capsulares en el mutante *cln1*, y en la cepa reconstituida. Este mutante carece de una ciclina G1/S

y por esa razón presenta una fase G1 anormalmente larga. Además, este mutante mostró una mayor capacidad para incrementar el tamaño de la cápsula, lo que sugería que factores que alargan la fase G1 resultan en una inducción mayor del tamaño de la capsula. Más aun, *cln1* fue incapaz de producir melanina y no presentó actividad lacasa, lo que sugiere que las proteínas que regulan el ciclo celular juegan un papel en la regulación de la expresión de los principales factores de virulencia de *Cryptococcus*.

2.-Formación de cedulas gigantes.

C. neoformans y *C. gattii* fueron capaces de producir células gigantes durante la infección tanto en ratones como en las larvas de *G. mellonella*.

La formación de células gigantes consistió no solo en el crecimiento de la capsula sino también en el crecimiento total de la célula incluyendo el cuerpo celular. Las células gigantes fueron fenotípicamente diferentes de las células cultivadas *in vitro*. Aunque los macrófagos fueron incapaces de fagocitar a las células gigantes, estas levaduras fueron reconocidas e indujeron la producción de citoquinas. Más aun, utilizamos el modelo de *G. mellonella* para estudiar la virulencia de las células gigantes y descubrimos que eran capaces de producir infección y dar lugar a una progenie de cedulas de tamaño regular.

Cryptococcus gattii produjo mayor proporción de células gigantes durante la infección que *C. neoformans*. Además, las células gigantes de *C. neoformans* y *C. gattii* fueron diferentes, ya que a diferencia de *C. neoformans*, las células gigantes de *C. gattii* no sufrieron un aumento del cuerpo celular llamativo, sino que sólo se produjo un aumento del tamaño de la cápsula.

Discusión

1.- Crecimiento de la cápsula

Nuestros resultados sugieren que los cambios morfológicos son un elemento clave en la virulencia de *Cryptococcus*. El crecimiento de la cápsula ocurre tanto en *G. mellonella* como en ratones, lo que sugiere que *Cryptococcus* ha adquirido estos rasgos virulentos a través de la interacción con huéspedes ambientales.

A pesar de que la cápsula de *Cryptococcus* ha sido ampliamente estudiada dada su capacidad para modular la respuesta inmune del huésped, los mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento de la cápsula no son conocidos. Nuestra estrategia para identificar posibles nuevos genes involucrados en este proceso nos dio una lista de candidatos que mostraron defectos en la capacidad para incrementar el tamaño de la cápsula y/o en la virulencia en *G. mellonella*. Sin embargo, los mutantes de estas proteínas requieren futuros estudios para estudiar el papel de estas proteínas en el proceso de crecimiento capsular.

Alternativamente, estudiamos fenotipos capsulares en mutantes de reguladores del ciclo celular. Demostramos que el crecimiento de la cápsula ocurre principalmente durante la fase G1 del ciclo celular. Nuestros resultados indican que factores que regulan el tamaño de la célula durante la fase G1 (por ejemplo, la ruta TOR) están también involucrados en la regulación del crecimiento de la cápsula. Además, nuestros resultados sugieren que la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular no está únicamente regulada por el tamaño del cuerpo celular, sino también por el tamaño de la cápsula en *C. neoformans*.

Además, *cln1* fue incapaz de producir melanina en medio L-DOPA, lo que significa que esta ciclina en particular, actúa como regulador de la expresión de los dos principales factores de virulencia de *C. neoformans*.

2.- Formación de células gigantes

La formación de las células gigantes supone un problema para el sistema inmune simplemente debido a su tamaño. La formación de células gigantes ocurre tanto en *G. mellonella* como en ratones, lo que sugiere que este cambio morfológico contribuye a la supervivencia de *Cryptococcus* en el huésped. Las células gigantes no son fagocitadas por los macrófagos; Sin embargo, sí que son reconocidas e inducen la producción de citoquinas en los macrófagos, lo que puede llevar a una respuesta exagerada del sistema inmune. Además, la formación de células gigantes es diferente en *C. neoformans* y en *C. gattii*. En ratones, *C. neoformans* forma células gigantes incrementando tanto el tamaño del cuerpo celular como el de la cápsula proporcionalmente. En cambio, *C. gattii* parece haber desarrollado otra estrategia y forma células gigantes principalmente mediante la adición de nuevo polisacárido a la cápsula, dando lugar a células gigantes con cuerpos celulares pequeños y cápsulas muy grandes y densas. Estas diferencias se correlacionan con la distinta epidemiología y enfermedad causadas por estas especies. Pensamos que *C. gattii*, al formar mayor proporción de células gigantes, es más difícil de eliminar, con lo que tiene mayor facilidad para infectar a individuos inmunocompetentes. Además, las diferencias en la eficacia de formación de células gigantes entre *C. neoformans* y *C. gattii* también se correlaciona con el tipo de enfermedad que provocan. Mientras que *C. neoformans* normalmente disemina al sistema nervioso central, la mayor eficiencia de *C. gattii* para formar células gigantes explica porque este patógeno produce principalmente neumonía y dificulta la diseminación a otros órganos.

En resumen, la morfogénesis de los hongos no solo consiste en la transición de levadura a hifas. *Cryptococcus* es capaz de inducir un complejo programa morfológico durante la infección, que resulta en distintas formas celulares que contribuyen a la evasión del sistema inmune y a la supervivencia en el huésped. Por esta razón, pensamos que nuestro trabajo contribuye significativamente a la comprensión de la patogénesis de *Cryptococcus*.

Introducción

1.- Importancia de las infecciones fúngicas

Los hongos patógenos son una de las causas más frecuentes de infección en humanos. Clásicamente, estos hongos han estado asociados a infecciones superficiales (piel y mucosas). Sin embargo, en las últimas décadas, se ha producido un aumento significativo en el número de infecciones fúngicas oportunistas invasivas, lo cual ha supuesto un cambio conceptual en el campo de la micología clínica. Este aumento se debe a la aparición de algunas enfermedades, como el sida, pero también a determinados avances médicos. El desarrollo de las UCIs, la introducción de la quimioterapia y corticoterapia, y el uso de implantes quirúrgicos, principalmente catéteres, han permitido el tratamiento de un gran número de pacientes que anteriormente no podían tratarse (enfermos que han sufrido un trasplante de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos, enfermos hematológicos, individuos con quemaduras, enfermos portadores de dispositivos médicos como catéteres y neonatos de poco peso) (Aziz *et al.*, 2012; Singh, 2001). Pero estas terapias también han causado un aumento en el número de pacientes inmunodeprimidos, los cuales son susceptibles a desarrollar infecciones oportunistas (Branski *et al.*, 2009; Hazen, 1995; Hsieh *et al.*, 2012; McNeil *et al.*, 2001; Miceli *et al.*, 2011; Simonsen *et al.*, 1998; Warnock, 2007).

Las principales enfermedades fúngicas invasoras son la candidiasis, la aspergilosis y la criptococosis. La mortalidad asociada a estas infecciones es muy alta, y depende de muchos factores, como la enfermedad de base, la zona geográfica, el tipo de infección y el tratamiento (Erjavec *et al.*, 2009; Miceli y Lee, 2008; Rueping *et al.*, 2009; Warnock, 2007). Además, las infecciones fúngicas suponen un alto coste al sistema nacional de salud, ya que se ha estimado que incrementan el tratamiento del paciente en 30.000-50.000 euros. Por ello, las infecciones fúngicas oportunistas se han convertido en un problema sanitario de primer orden.

2.- Criptococosis y *Cryptococcus*

La criptococosis es una enfermedad sistémica causada por levaduras del género *Cryptococcus*, perteneciente al grupo de los basidiomicetos. Este género contiene al menos 40 especies, de las que *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* son los agentes más frecuentes causantes de la criptococosis (Casadevall y Perfect, 1998). La criptococosis tiene varias presentaciones clínicas, siendo las más frecuentes la infección pulmonar y la diseminación al sistema nervioso central (meningoencefalitis).

La principal característica fenotípica de *C. neoformans* y *C. gattii* es la presencia de una cápsula que rodea al cuerpo celular (Benham, 1935). Las células se observan al microscopio como levaduras esféricas, con un diámetro que oscila entre 4-9 µm incluyendo la cápsula. Ambas especies son microorganismos ambientales, y se encuentran en múltiples nichos, como en los

guanos de las palomas, los árboles, los estanques y el suelo, por lo que se piensa que las levaduras se adquieren del ambiente por inhalación de esporas (Casadevall and Perfect 1998, Velagapudi et al 2009).

Aunque *C. neoformans* y *C. gattii* tienen características similares, el tipo de enfermedad y la epidemiología son diferentes. A continuación se resumen las principales características de ambas especies.

2.1.- *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans afecta principalmente a individuos inmunodeprimidos. El principal factor de riesgo asociado a este patógeno es el SIDA (Crowe *et al.*, 1991; Currie y Casadevall, 1994). Su distribución es cosmopolita (Lazera *et al.*, 2000), y se aísla de múltiples nichos, principalmente del guano de paloma y barrizales (Casadevall y Perfect, 1998).

Aunque todavía no se ha demostrado, se cree que *C. neoformans* se adquiere por inhalación de esporas, por lo que el pulmón es el primer órgano colonizado por este patógeno (Casadevall and Perfect 1998, Velagapudi et al 2009). En individuos inmunocompetentes, la infección es controlada por el huésped. Sin embargo, en condiciones de inmunosupresión (principalmente aquellas que implican un descenso en el número de linfocitos T) puede producirse una infección invasiva que conlleva la diseminación por el torrente sanguíneo y el alojamiento en el sistema nervioso central, donde causa meningoencefalitis, resultando fatal si no es tratada adecuadamente (Casadevall and Perfect 1998).

Las infecciones producidas por *C. neoformans* han sido una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes VIH, ya que entre el 5-10% de los individuos con linfopenia CD4+ desarrollaron criptococosis durante las dos últimas décadas del siglo XX (Casadevall y Perfect, 1998). Aunque la incidencia de la criptococosis ha disminuido significativamente en los países desarrollados gracias a la introducción de la terapia antiretroviral de alta actividad (HAART), la mortalidad asociada sigue siendo alta (Chottanapund *et al.*, 2007; Dromer *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2007; Lortholary *et al.*, 2006; Mirza *et al.*, 2003).

En regiones en vías de desarrollo, la incidencia de la criptococosis está lejos de estar controlada, estimándose en 720.000 nuevos casos al año en el África sub-sahariana y 120.000 en el sudeste asiático (Park *et al.*, 2009). En estas regiones, junto con Latinoamérica y el Caribe, la mortalidad oscila entre el 55-70%, ascendiendo el número de muertes a más de 650.000 al año.

2.2.- *Cryptococcus gattii*

Cryptococcus gattii parece tener una distribución global diferente a *C. neoformans*. Los primeros estudios sugirieron que se encuentra en áreas de clima tropical y subtropical (Kwon-Chung y

Bennett, 1984). Sin embargo, otros estudios indican que *C. gattii* podría tener una distribución mucho más amplia (Campbell *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). Esta levadura se ha asociado clásicamente con la corteza de los eucaliptos (Ellis y Pfeiffer, 1992; Fortes *et al.*, 2001; Pfeiffer y Ellis, 1992). Al igual que *C. neoformans*, *C. gattii* se adquiere por inhalación. Sin embargo, la principal diferencia entre ambas especies es que *C. gattii* causa enfermedad en personas inmunocompetentes, y no está asociado a la infección por VIH (Sorrell, 2001). En algunas regiones, como el norte de Brasil, *C. gattii* es endémico y se le atribuyen más del 60% de todos los casos de criptococosis (Nishikawa *et al.*, 2003).

El cuadro clínico más característico es neumonía, detectándose meningitis en una minoría de los casos en los que suele haber algún defecto inmunológico (Harris *et al.*, 2011; Ngamskulrungronj *et al.*, 2012).

Pese a constituir únicamente el 1% de todas las infecciones de criptococosis mundiales, *C. gattii* cobró gran importancia cuando se descubrió que esta especie era el agente causante de un brote detectado en la isla de Vancouver, en Canadá en 1999 (Hoang *et al.*, 2004). Estas cepas se han extendido en la actualidad a otras regiones de Canadá y al Noroeste del Pacífico (Byrnes *et al.*, 2009; Byrnes y Heitman, 2009; Byrnes *et al.*, 2010; Byrnes y Marr, 2011; Galanis y Macdougall, 2010; Kidd *et al.*, 2007; MacDougall *et al.*, 2007). Por ello, el estudio de la virulencia de *C. gattii* es un tema de gran interés para la comunidad científica.

3.- Nomenclatura y clasificación de *Cryptococcus*

Clásicamente, *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* se han clasificado en 4 serotipos: A y D (*neoformans*) y B y C (*gattii*). En la actualidad, el serotipo A se denomina *C. neoformans* variedad *grubii*, el serotipo D *C. neoformans* variedad *neoformans*, y los serotipos B y C corresponden a *C. gattii* (Franzot *et al.*, 1999). Además, se han descrito híbridos entre cepas de diferente serotipo. Los híbridos AD se forman tras la fusión de cepas del serotipo A y el serotipo D seguido de una meiosis no completa debido a incompatibilidades genéticas (Boekhout *et al.*, 2001; Cogliati *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). Recientemente, se han descrito también híbridos A/B y B/D (Aminnejad *et al.*, 2012; Bovers *et al.*, 2006).

El desarrollo de distintas técnicas de biología molecular ha permitido una clasificación más detallada de las especies *C. neoformans/gattii*. Usando distintas técnicas como PCR fingerprinting, AFLP, RFLP o genotipado por secuenciación de las regiones IGS del ADN ribosomal, *C. neoformans/gattii* se divide en diferentes genotipos (Tabla 1). *Cryptococcus neoformans* contiene los siguientes subgrupos: VNI y VNII (AFLP1A y AFLP1B), que corresponden a la variedad *grubii*, VNIII (AFLP 3), que corresponde a los híbridos A/D, y VNIV (AFLP 2), que corresponde a la variedad *neoformans* (Aminnejad *et al.*, 2012; Barreto de Oliveira *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 1999;

Meyer y Mitchell, 1995). *Cryptococcus gattii* se divide en 4 subgrupos distintos: VGI (AFLP4), VGII (AFLP6), VGIII (AFLP5) y VGIV (AFLP7) (Kidd *et al.*, 2004; Trilles *et al.*, 2008) (Tabla 1).

Cepa	Serotipo	PCR fingerprinting Tipo molecular	AFLP genotipo
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	VNI, VNII	AFLP1
AD híbrido	AD	VNIII	AFLP3
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	VNIV	AFLP2
<i>C. gattii</i>	B/C	VGI	AFLP4
		VGII	AFLP6
		VGIII	AFLP5
		VGIV	AFLP7

Tabla 1. Clasificación del complejo *Cryptococcus*

4.- Interacción con el huésped

Cryptococcus interfiere con la respuesta del sistema inmune por lo que este patógeno se ha utilizado ampliamente para la investigación de la interacción patógeno-huésped. En las siguientes secciones se resumen algunas de las características más importantes de la interacción de *Cryptococcus* con el sistema immune.

4.1.- Respuesta inmune durante la criptococosis

La interacción entre *Cryptococcus neoformans* y el sistema inmune es muy compleja y ha sido ampliamente estudiada (ver revisión en (Heitman *et al.*, 2011) y (Vecchiarelli, 2000a; Vecchiarelli, 2007; Vecchiarelli, 2000b)). En general, la respuesta más eficaz es la basada en una respuesta Th1. Las células T CD4/CD8 juegan un papel muy importante en el control de la infección por *C. neoformans*, por ello, los pacientes con bajo recuento de células T CD4+ (como ocurre en los enfermos VIH) son susceptibles a la infección. Se ha descrito una relación entre el desarrollo de una respuesta inmune Th1, promovida por IL-12 e interferón gamma, y la protección frente a *Cryptococcus* (Koguchi y Kawakami, 2002; Zhang *et al.*, 2009). En cambio, una respuesta Th2, basada en la producción de anticuerpos e inducida por IL-1, IL-10, IL-13, se ha asociado a la no protección frente a *Cryptococcus* (Muller *et al.*, 2007). Con respecto a las células T reguladoras y

células Th17, su papel durante la criptococosis está poco estudiado, aunque algunos estudios indican que la inducción de una respuesta Th17 tiene un efecto protector (Wozniak *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009).

El sistema del complemento también juega un papel importante durante protección frente a *Cryptococcus*, ya que ratones deficientes en C3 e incapaces de activar la vía alternativa del complemento son más sensibles a la criptococosis (Diamond *et al.*, 1973; Diamond *et al.*, 1974; Dromer *et al.*, 1989).

4.2.- Interacción con células fagocíticas: Fagocitosis y parasitismo intracelular

Los macrófagos y los neutrófilos son las primeras células encargadas de contener la infección tras la inhalación del patógeno. Por ello, el papel de la fagocitosis se ha estudiado en detalle en la respuesta inmune frente a *Cryptococcus*.

4.2.1.- Mecanismos antifagocíticos.

Cryptococcus neoformans ha desarrollado mecanismos que inhiben la interacción e internalización por macrófagos. Se han descrito dos tipos de mecanismos antifagocíticos: cápsula dependientes y cápsula independientes.

Los primeros estudios demostraron que la cápsula inhibe la fagocitosis, y que mutantes acapsulares son fagocitados con normalidad (Kozel y Gotschlich, 1982). La fagocitosis tiene lugar tras la unión de receptores de los macrófagos con epítopos presentes principalmente en la pared celular. Así, en el caso de *Cryptococcus*, la cápsula inhibe la fagocitosis ya que impide la unión de los receptores fagocíticos con los epítopos de la pared (Small y Mitchell, 1989).

En los últimos años, se han descrito mecanismos adicionales que inhiben la fagocitosis de *C. neoformans* que no dependen de la cápsula. El primero de ellos depende de la proteína antifagocítica App1, la cual es secretada e inhibe la fagocitosis ya que se une a los receptores CR2 y CR3, impidiendo el reconocimiento de *Cryptococcus* por parte de los macrófagos (Luberto *et al.*, 2003; Stano *et al.*, 2009). El segundo mecanismo depende de la proteína Gat201, que es un regulador de la transcripción cuya delección altera la expresión de alrededor de 1000 genes entre los que se encuentran numerosos genes ya asociados a la virulencia de *Cryptococcus* como *CIR1* y *LIV3*. Además, células de *Cryptococcus* carentes de Gat201 son eliminadas a los 3 días de la infección, por lo que parece que Gat201 tiene un papel importante en la evasión de la fagocitosis al inicio de la infección (Chun *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008).

4.2.2.- Mecanismos que permiten la fagocitosis de *C. neoformans*.

A pesar de estos mecanismos antifagocíticos, *Cryptococcus* se fagocita *in vivo*, y de hecho, *Cryptococcus* se encuentra mayoritariamente dentro de los macrófagos al cabo de pocas horas de

la infección (Feldmesser *et al.*, 2000). La fagocitosis de *Cryptococcus* ocurre mediante opsoninas, las cuales se unen a la cápsula e inducen la fagocitosis tras la unión a receptores específicos del macrófago. Estas opsoninas son principalmente las proteínas del sistema del complemento (Kozel *et al.*, 1984; Kozel *et al.*, 1988; Kozel *et al.*, 1989), que inducen la fagocitosis a través de los receptores CR, y los anticuerpos, que se unen a los receptores Fc (Saylor *et al.*, 2010; Taborda y Casadevall, 2002; Yuan *et al.*, 1998). Finalmente, cambios en la estructura de la cápsula pueden exponer epítomos que son reconocidos por receptores del macrófago (principalmente CD18, CD206 y CD209) (Mansour *et al.*, 2006; Monari *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2002) (Figura 1).

4.2.3.- *Cryptococcus* como patógeno intracelular facultativo.

Aunque los macrófagos tienen capacidad antimicrobiana, existen patógenos que son capaces de evadir la muerte y proliferar intracelularmente. *Cryptococcus* pertenece a este grupo de microorganismos, y por ello, se le considera un patógeno intracelular oportunista. De hecho, una vez internalizado, se han observado varios fenómenos, los cuales se describirán brevemente a continuación.

- Supervivencia y replicación intracelular

Los primeros estudios demostraron que los macrófagos pueden eliminar las células de *C. neoformans* una vez han sido fagocitadas (Levitz, 1994). Sin embargo, también se han descrito situaciones en las que *Cryptococcus* es capaz de evadir la muerte y replicarse en el interior de las células fagocíticas (Del Poeta, 2004) (Figura 1).

La cápsula es imprescindible para la supervivencia de *Cryptococcus* en el interior del macrófago, ya que permite su replicación el interior de la célula fagocítica (Feldmesser *et al.*, 2000) y además le protege de los radicales libres y otros ataques del sistema inmune (Zaragoza *et al.*, 2008). La replicación intracelular se ha estudiado en profundidad *in vitro* (Coenjaerts *et al.*, 2006; Diamond y Bennett, 1973; Lee *et al.*, 1995; Mitchell y Friedman, 1972; Tucker y Casadevall, 2002), observándose que ocurre a mayor velocidad que la gemación fuera de los macrófagos, lo que indica que *C. neoformans* ha desarrollado distintas estrategias para adaptarse al ambiente del fagolisosoma (Levitz *et al.*, 1999). *Cryptococcus* no inhibe la fusión fagosoma-lisosoma, pero sí afecta a su funcionalidad, ya que los fagolisosomas que contienen células de *Cryptococcus* se vuelven permeables (Tucker y Casadevall, 2002). Además, *Cryptococcus* reduce la producción de óxido nítrico (Naslund *et al.*, 1995), lo que facilita su supervivencia en el interior del macrófago (Alvarez *et al.*, 2009; Diamond y Bennett, 1973; Lee *et al.*, 1995) (Figura 1).

- Extrusión o vomocitosis

Tras evadir la muerte por parte del macrófago, *Cryptococcus* puede escapar de las células fagocíticas del huésped de diferentes maneras. Una replicación intracelular masiva de las levaduras puede resultar en la explosión del macrófago. Pero además, se han descrito otros

mecanismos por lo que *Cryptococcus* sale de los macrófagos sin que se vea afectada la viabilidad de las levaduras o de las células fagocíticas. Este fenómeno se denomina extrusión o vomocitosis y consiste en la salida de *C. neoformans* de las células fagocíticas a través de un proceso similar a la exocitosis (Alvarez y Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006; Voelz *et al.*, 2011). Aunque originalmente se observó *in vitro*, recientemente se ha demostrado que la extrusión también ocurre *in vivo* (Nicola *et al.*, 2011) (Figura 1).

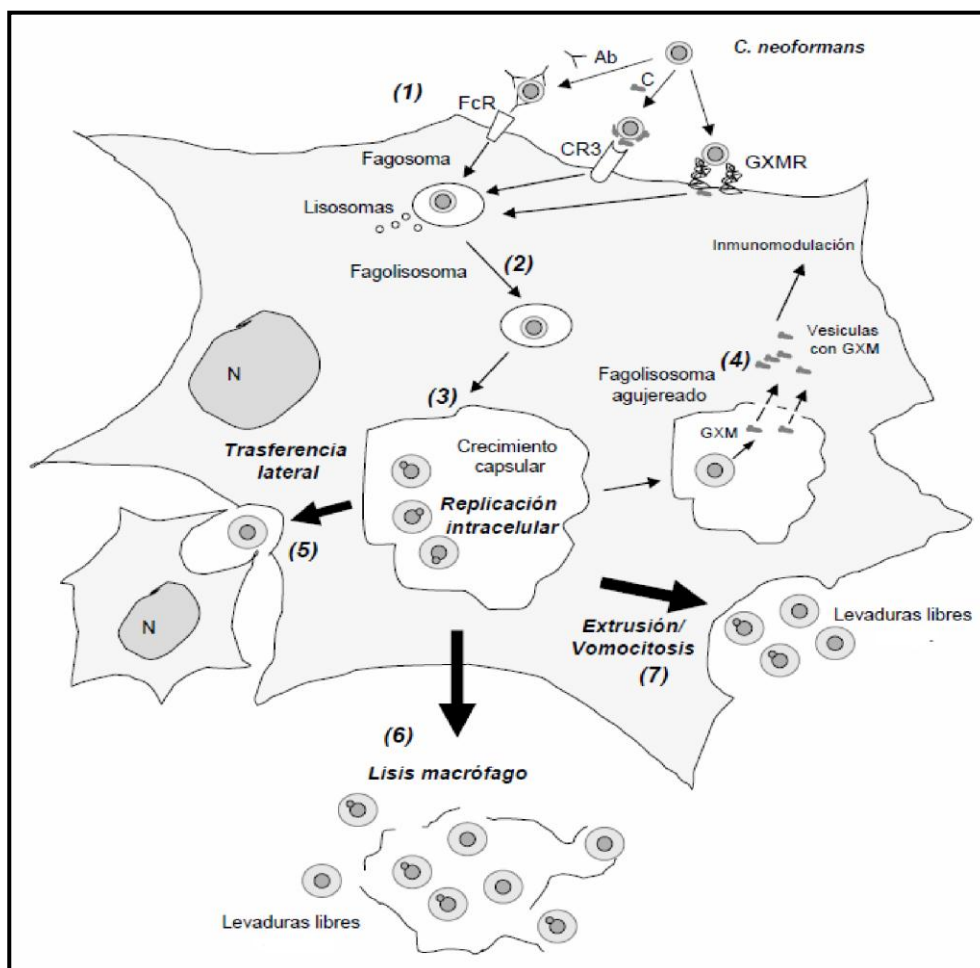


Figura 1. Resumen de los posibles desenlaces de la interacción entre *C. neoformans* y macrófagos. (1) Internalización mediada por anticuerpos, proteínas de complemento o por reconocimiento directo del GXM (2) Formación del fagolisosoma (3) Supervivencia en el interior del macrófago (4) Formación de poros en el fagolisosoma (5) Transferencia lateral entre macrófagos (6) Rotura del macrófago y liberación de levaduras vivas (7) Extrusión o vomocitosis. Adaptación de la figura de (García-Rodas y Zaragoza, 2012).

- Transferencia lateral de *Cryptococcus* entre macrófagos

Finalmente, *C. neoformans* puede ser transferido entre macrófagos, fenómeno denominado transferencia lateral. Este proceso está poco estudiado, pero se cree que es un mecanismo de diseminación de las levaduras sin que se expongan a los ataques del sistema inmune (Alvarez y Casadevall, 2007). También se ha interpretado como un mecanismo de defensa de macrófagos

con demasiadas levaduras en su interior, pudiendo transferirlas a otros macrófagos con mayor capacidad antimicrobiana (Figura 1).

4.3.- Diseminación al sistema nervioso central (SNC)

Uno de los aspectos más importantes en la enfermedad causada por *Cryptococcus* es su capacidad para diseminar y alojarse en el cerebro tras cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) (Dromer *et al.*, 2007). Se han propuesto tres mecanismos que permiten a *C. neoformans* atravesar la BHE: 1) *Cryptococcus* puede traspasar la BHE en el interior de células fagocitas, mediante un mecanismo que se ha denominado el “caballo de Troya” (Charlier *et al.*, 2009; Dromer y Levitz, 2011; Kim, 2008); 2) la penetración transcelular (Chang *et al.*, 2004), la cual se produce tras la internalización de las levaduras por el lado laminal mediante endocitosis y expulsión de las células por el lado basal de la BHE. Este mecanismo se produce sin daño de las células que componen la BHE. 3) Por último, también se puede producir penetración paracelular (Charlier *et al.*, 2005), que implica el deterioro de la lámina basal debido a la alteración del citoesqueleto de las células endoteliales de la red capilar del cerebro (Chen *et al.*, 2003). Ninguno de estos tres mecanismos son mutuamente excluyentes y distintas evidencias demuestran que todos ellos contribuyen en la invasión y colonización del cerebro (Casadevall, 2010).

4.4.- Latencia y reactivación

Además de causar infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos, *Cryptococcus* también puede causar una infección latente asintomática, y perdurar en el huésped durante largos periodos de tiempo (Davis *et al.*, 2007; Garcia-Hermoso *et al.*, 1999). Además del estado latente, hay también evidencias de infecciones subclínicas y reactivaciones tras seguir un tratamiento con inmunosupresores en pacientes que desarrollan criptococosis tras ser sometidos a trasplantes (Saha *et al.*, 2007). El mecanismo mediante el cual *C. neoformans* permanece latente en el huésped es aún desconocido. Las levaduras podrían permanecer en nódulos por debajo de la pleura y en los nódulos linfáticos (Paterson *et al.*, 1998), aunque se ha postulado que en los hombres *Cryptococcus* se localiza preferentemente en la próstata (Larsen *et al.*, 1989). Los macrófagos constituyen otro nicho para el estado latente de *C. neoformans*, ya que como se ha expuesto anteriormente, esta levadura es un patógeno intracelular facultativo. Las ratas son el modelo animal mejor caracterizado para el estudio de la latencia de *C. neoformans* (Goldman *et al.*, 1994), ya que son intrínsecamente resistentes a la criptococosis. En este modelo, se ha demostrado que el hongo no es eliminado, y que la infección permanece en estado crónico gracias a la formación de granulomas donde las células de *Cryptococcus* se encuentran mayoritariamente en el interior de los macrófagos (Goldman *et al.*, 2000).

5.- *Cryptococcus* como patógeno ambiental

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* son microorganismos ambientales capaces de interactuar con una gran variedad de huéspedes. Para investigar la importancia de estas interacciones en la virulencia de *Cryptococcus* se han utilizado principalmente amebas, nematodos e insectos como modelos de huéspedes ambientales. En el caso de las amebas, se ha demostrado que los mecanismos de infección, fagocitosis y patogénesis intracelular están conservados entre amebas y macrófagos de mamífero (Malliaris *et al.*, 2004; Steenbergen y Casadevall, 2003; Steenbergen *et al.*, 2001). De manera similar, *Cryptococcus* infecta y produce la muerte de nematodos e insectos (Apidianakis *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2002; Mylonakis *et al.*, 2005). Por ello, se postula que los factores de virulencia mostrados durante la infección de huéspedes mamíferos habrían sido adquiridos como mecanismos de defensa durante la interacción con predadores ambientales (Casadevall *et al.*, 2003). Finalmente, es posible que los elementos necesarios para la virulencia también se mantengan a través de la infección de pequeños roedores y otros mamíferos salvajes, que tras morir, liberan cepas virulentas de *Cryptococcus* al ambiente (Idnurm *et al.*, 2005).

6.- Factores de virulencia

Cryptococcus neoformans es una levadura de especial interés para estudiar la virulencia fúngica, ya que ha desarrollado tanto mecanismos de adaptación al huésped, como factores de virulencia, que se definen como aquellos componentes del patógeno que causan daño en el huésped.

6.1.- Melanina

Una de las principales características de *Cryptococcus* es su capacidad de sintetizar melanina. La melanina es un pigmento negativamente cargado de color oscuro ampliamente distribuido en la naturaleza y que es hidrofóbico e insoluble en soluciones acuosas (Casadevall *et al.*, 2000). Existen distintos tipos de melaninas: eumelaninas, feomelanina, alomelaninas y piomelaninas (Carreira *et al.*, 2001; Plonka y Grabacka, 2006). En particular, *Cryptococcus* sintetiza eumelanina a partir de compuestos difenólicos o poliaminobencenos y oxígeno (Nurudeen y Ahearn, 1979). Algunos de estos compuestos, como la L-DOPA, son abundantes en el sistema nervioso central, por lo que se piensa que la melanización le confiere una ventaja selectiva a *Cryptococcus* durante la colonización de este órgano (Eisenman *et al.*, 2007).

La melanina es sintetizada por la enzima fenoloxidasas (lacasa) codificada por el gen *LAC1* (Williamson, 1994). La expresión de este gen está regulada por la concentración de hierro, cobre y glucosa (Alspaugh *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2009). La lacasa se localiza en la pared celular y contribuye a la supervivencia de *C. neoformans* ayudando a mantener la integridad de la pared

(Zhu *et al.*, 2001). Además, existe una segunda enzima lacasa, codificada por el gen *LAC2*, localizada en el citoplasma y cuya función es aún incierta (Heitman *et al.*, 2011; Missall *et al.*, 2005).

La melanina protege a las células de *Cryptococcus* de factores de estrés como la luz ultravioleta, radicales libres, y altas temperaturas, lo que facilita la supervivencia del hongo en el huésped (Casadevall *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999; Noverr *et al.*, 2004; Rosas y Casadevall, 1997; Wang y Casadevall, 1994). La melanina también podría participar en la captación de energía a partir de radiaciones en un proceso similar a la fotosíntesis (Dadachova *et al.*, 2007). Además, la inyección de partículas de melanina de *Cryptococcus* en ratones induce respuesta inflamatoria, lo que indica que este pigmento también puede modular la respuesta inmune y actuar como factor de virulencia.

6.2.- Crecimiento a 37°C, ureasa y fosfolipasas

La capacidad de crecer a temperatura fisiológica es esencial para la virulencia de microorganismos patógenos (Perfect, 2005). Aunque *Cryptococcus* crece a 37°C, su temperatura óptima de crecimiento es alrededor de 25-30°C, lo que le confiere la capacidad de infectar tanto a huéspedes ambientales como a mamíferos. En el ambiente, *Cryptococcus* se encuentra en el guano de los pájaros. Sin embargo, los pájaros no se infectan con *C. neoformans*, probablemente porque esta levadura no crece bien a la temperatura corporal de las aves, que oscila entre 40-42°C (Mitchell, 1995). Con respecto al crecimiento a 37°C, se han identificado muchas proteínas necesarias para crecer a esta temperatura, las cuales participan en rutas de señalización de estrés, ensamblaje de la pared celular, preservación de la integridad de la membrana celular y metabolismo basal (Kraus *et al.*, 2004; Rosa e Silva *et al.*, 2008; Steen *et al.*, 2003).

Otra de las características de *Cryptococcus* es la producción de la enzima ureasa que le permite utilizar urea exógena. La ureasa participa en la virulencia de *Cryptococcus*, ya que promueve la diseminación al cerebro (Olszewski *et al.*, 2004; Pettinato *et al.*, 1991) y polariza la respuesta del sistema inmune a una respuesta Th2, impidiendo la eliminación de la infección (Osterholzer *et al.*, 2009).

Finalmente, también se han descrito dos fosfolipasas (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1997; Vidotto *et al.*, 1996) que promueven la supervivencia y facilitan la replicación de *C. neoformans* en los macrófagos *in vitro* (Santangelo *et al.*, 2004).

6.3.- Cápsula

La cápsula de *Cryptococcus* es su principal característica fenotípica. Esta estructura es visible en suspensiones de las levaduras en tinta china como un halo refringente. La cápsula no solo confiere a *Cryptococcus* determinadas características físico-químicas, sino que también juega un papel muy

importante en la interacción con el huésped. De hecho, la cápsula es el principal factor de virulencia de esta levadura, y por ello, es la estructura más estudiada de este patógeno.

6.3.1.-Estructura y organización

La cápsula se compone en un 90-95% de glucuronoxilomanano (GXM), 5-8% de galactoxilomanano (GalXM) y manoproteínas (<1%) (Raschke *et al.*, 1978; Zaragoza *et al.*, 2008). El GXM es un polímero largo compuesto por repeticiones de manosa con ramificaciones de ácido glucurónico y xilosas. Esta estructura determina el serotipo de *C. neoformans* y *C. gattii*, ya que diferencias en la estructura y composición del polisacárido de la cápsula resultan en diferencias antigénicas (Cherniak y Sundstrom, 1994). El GalXM se ha descrito clásicamente como un polímero de galactosas con ramificaciones de manosas y xilosas (Vaishnav *et al.*, 1998). Recientemente, se ha descrito que este polisacárido también contiene residuos de ácido glucurónico, por lo que ha sido renombrado como glucuronoxilomananogalactano (GXMGal). La localización del GXMGal en la cápsula de *Cryptococcus* no se conoce en detalle. Los primeros estudios indicaron que el GXMGal se encontraba asociado a la pared celular (Vaishnav *et al.*, 1998; van de Moer *et al.*, 1990). Sin embargo, recientemente se ha descrito como un compuesto en transición, asociado a vesículas y muy probablemente a la cápsula en formación o de nueva síntesis (De Jesus *et al.*, 2009). Las manoproteínas (MP) son el componente minoritario de la capsula, y aunque tienen un efecto inmunogénico durante la infección, su papel en la estructura de la cápsula es aún desconocido (Mansour *et al.*, 2004; Pietrella *et al.*, 2005; Specht *et al.*, 2007).

6.3.2.- Genes involucrados en la síntesis de la cápsula

Los primeros genes involucrados en la síntesis de la cápsula se clonaron en los años 90, y se denominaron genes *CAP* (*CAP 10*, *CAP59*, *CAP60* y *CAP64*). Todos ellos son necesarios para la virulencia de *C. neoformans* en ratones (Chang y Kwon-Chung, 1994; Chang y Kwon-Chung, 1998; Chang y Kwon-Chung, 1999; Chang *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1995). Posteriormente se han descrito más genes involucrados en la formación de la cápsula, como son *CAS1* y *CAS3* (Janbon *et al.*, 2001; Moyrand *et al.*, 2004) y otros genes involucrados en las modificaciones que sufre el polisacárido, como la xilosilación y la acetilación (*UXS1*, *UGD1* y *CAS31*, *CAS32*, *CAS33*, *CAS34* y *CAS35*) (Bar-Peled *et al.*, 2001; Janbon *et al.*, 2001; Kozel *et al.*, 2003; Moyrand *et al.*, 2004). Además, el análisis del genoma permitió la identificación de otros genes involucrados en la síntesis de la cápsula, como la familia de *CAP64* y la familia de *CAP10* (Loftus *et al.*, 2005). Más recientemente, en una amplia revisión sobre la cápsula de *Cryptococcus*, O'Meara y Alspaugh recopilan no sólo los genes involucrados en la síntesis y crecimiento de la cápsula sino también las rutas y señales de transducción involucradas en estos procesos, como la detección de niveles de hierro en el ambiente a través de Cir1, la respuesta a estrés mediada por la ruta Hog1, y la ruta Pka1-AMPC que interviene tanto en la detección de niveles de glucosa y nitrógeno a través de los

receptores acoplados a proteínas G, como en el equilibrio del pH a través de Rim101 (O'Meara y Alspaugh, 2012).

Aunque se conocen genes necesarios para la síntesis de la cápsula, la función bioquímica de muchas de las proteínas que codifican todavía no se ha caracterizado. Además, tampoco se sabe con detalle como se transporta el polisacárido al exterior de la célula y como se ensambla para formar la cápsula. En este sentido, se ha descrito el transporte de GXM, GXMGal, pigmentos, proteínas y lípidos en vesículas a través de la pared celular en *C. neoformans* (Casadevall *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2008b; Rodrigues *et al.*, 2007). Estas vesículas tienen un tamaño variable (Rodrigues *et al.*, 2008b; Rodrigues *et al.*, 2007) y se sabe que pueden participar en la interacción entre *C. neoformans* y las células fagocíticas del huésped (Oliveira *et al.*, 2010).

6.3.3. Cápsula como factor de virulencia y su efecto en el huésped

La cápsula es importante para la supervivencia de *C. neoformans* en el huésped, ya que inhibe la fagocitosis en ausencia de opsoninas (Kozel y Gotschlich, 1982; Tucker y Casadevall, 2002). Además, el polisacárido de la cápsula es liberado al medio, y se ha demostrado que este exopolisacárido altera la respuesta inmune. En los macrófagos, *C. neoformans* libera este polisacárido en vesículas cuya acumulación en el citoplasma del macrófago tiene efectos tóxicos para el macrófago (Feldmesser *et al.*, 2000; Grechi *et al.*, 2011; Tucker y Casadevall, 2002). El polisacárido también inhibe la migración de neutrófilos (Dong y Murphy, 1997; Dong y Murphy, 1995; Ellerbroek *et al.*, 2004), interfiere con la secreción de citoquinas (Retini *et al.*, 1996), induce apoptosis de células T y macrófagos (Vecchiarelli *et al.*, 2011; Villena *et al.*, 2008), inhibe la proliferación de células T (Yauch *et al.*, 2006) y retrasa la maduración y activación de células dendríticas (Lupo *et al.*, 2008; Vecchiarelli *et al.*, 1994). Por todo ello, la cápsula de *Cryptococcus* constituye el factor de virulencia más característico entre los hongos patógenos.

7.- Morfogénesis

Una característica que los hongos patógenos utilizan para adaptarse al huésped es su capacidad de inducir cambios morfológicos, sobre todo filamentos e hifas. *Cryptococcus* se ha considerado tradicionalmente un hongo sin crecimiento filamentoso ni dimórfico excepto durante la reproducción sexual (ver revisión en (Kozubowski y Heitman, 2012)), aunque ocasionalmente se han descrito pseudohifas y formas amorfas en secciones histopatológicas (Gazzoni *et al.*, 2010; Neilson *et al.*, 1981; Neilson *et al.*, 1978; Williamson *et al.*, 1996). De esta manera, *Cryptococcus* se encuentra *in vitro* y durante la infección mayoritariamente en forma de blastoconidia esférica. Sin embargo, *Cryptococcus* posee un complejo programa morfológico que resulta en la aparición de distintos tipos celulares durante la infección. Se ha descrito que *Cryptococcus* experimenta, tanto *in vitro*

como *in vivo*, cambios en el tamaño y en la estructura de su cápsula que producen la aparición de células morfológicamente distintas. Estos cambios tienen gran importancia, ya que se ha demostrado que contribuyen a evadir la respuesta inmune. A continuación se resumen los principales cambios que *Cryptococcus* puede inducir durante la infección.

7.1.- Cambios en la estructura de la cápsula

La estructura de la cápsula de *Cryptococcus* puede variar dependiendo las condiciones ambientales. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente al GXM ha permitido observar diferencias inter e intra-cepa (McFadden *et al.*, 2007). Incluso en las mismas condiciones de crecimiento, distintas células del mismo cultivo unen el anticuerpo de forma diferente, lo que se ha relacionado con diferencias de edad de las células (Cordero *et al.*, 2011a; Cordero *et al.*, 2011b). En este sentido, se ha observado que las células más viejas son más resistentes a la liberación de la cápsula inducida por γ -radiación que las células más jóvenes (Maxson *et al.*, 2007b). Además, la estructura de la cápsula cambia sus propiedades antigénicas durante el desarrollo de la infección (García-Hermoso *et al.*, 2004).

La densidad de la cápsula también es variable según las condiciones ambientales. Se ha demostrado que durante el envejecimiento se produce una acumulación de polisacárido en la cápsula (Cordero *et al.*, 2011b; Maxson *et al.*, 2007b). Además, las células de *Cryptococcus* aisladas de ratones presentan una mayor densidad de polisacárido que las células cultivadas *in vitro* (Gates *et al.*, 2004). Los cambios de la densidad y empaquetamiento de las fibras de polisacárido son importantes, ya que influyen en la permeabilidad de la cápsula a moléculas, como proteínas del sistema del complemento y anticuerpos (Charlier *et al.*, 2005; García-Hermoso *et al.*, 2004; Gates *et al.*, 2004).

Los cambios estructurales de la cápsula tienen consecuencias importantes, ya que influyen en el reconocimiento del patógeno por el huésped. Muchas respuestas desarrolladas por las células del sistema inmune (como secreción de anticuerpos y producción de citoquinas entre otros) dependen del reconocimiento de la cápsula. Por ello, cambios en la estructura de la cápsula contribuyen a que las células de *C. neoformans* no sean reconocidas por las células del sistema inmune (Cleare y Casadevall, 1998; Kozel *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 1998; Todaro-Luck *et al.*, 1989). Estos cambios estructurales se han relacionado también con la capacidad de diseminación y colonización de distintos órganos (Charlier *et al.*, 2005; García-Hermoso *et al.*, 2004).

7.2.- Cambios de tamaño de la cápsula

Los cambios en el tamaño de la cápsula son característicos de la interacción de *C. neoformans* con el huésped. En condiciones de laboratorio y en el ambiente, el tamaño de la cápsula es pequeño

(1-2 micras). Sin embargo, tras ser inhalada, *Cryptococcus* aumenta significativamente el tamaño de la cápsula, de manera que trascurridas pocas horas de infección alcanza entre 5-10 micras. Por ello, este cambio se considera una respuesta morfológica temprana (Feldmesser *et al.*, 2001a). Este fenómeno también se ha observado durante el parasitismo intracelular de macrófagos (Ma *et al.*, 2006) y durante la infección de amebas (Chrisman *et al.*, 2011). El aumento del tamaño de la cápsula protege a *C. neoformans* frente a radicales libres, péptidos antimicrobianos y diferentes enzimas líticas (Zaragoza *et al.*, 2008).

Hay varios factores que inducen el crecimiento de la cápsula *in vitro*, como una atmósfera rica en CO₂ (5%), baja concentración de hierro, suero, limitación de nutrientes en un ambiente con pH básico y el manitol (Granger *et al.*, 1985; Guimaraes *et al.*, 2010; Vartivarian *et al.*, 1993; Zaragoza y Casadevall, 2004; Zaragoza *et al.*, 2003a). Sin embargo, se sabe muy poco sobre su regulación y los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno. Se ha demostrado que tras el crecimiento capsular existe una correlación entre el tamaño de la capsula y el tamaño del cuerpo celular, lo que sugiere que factores que regulan el tamaño de la célula también regulan el tamaño de la cápsula (Zaragoza y Casadevall, 2006; Zaragoza *et al.*, 2003a). El aumento de tamaño del cuerpo celular se produce principalmente en la fase G1 del ciclo celular, por lo que la coordinación entre el crecimiento capsular y el crecimiento de la célula sugiere que ambos procesos ocurren en la misma fase del ciclo celular.

7.3.- Cambios en el tamaño total de la célula

El último cambio morfológico característico de *Cryptococcus* afecta no sólo al tamaño de la cápsula, sino también al tamaño total de la célula incluyendo el cuerpo celular. De esta manera, durante la infección aparecen células que aumentan de manera global el tamaño, formando lo que se ha denominado células gigantes o titanes. *In vitro* *C. neoformans* tiene un diámetro entre 4-9 µm incluyendo la cápsula. Sin embargo, *in vivo*, al cabo de varias semanas de infección, las células pueden alcanzar hasta 100 µm (Feldmesser *et al.*, 2001b; Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). A diferencia de las células cultivadas *in vitro*, las células gigantes son poliploides y se ha sugerido que se forman por un proceso de endoreduplicación (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Las células gigantes se han descrito principalmente en el pulmón de ratón, donde la proporción en la que se encuentran es muy variable. En condiciones regulares, el porcentaje de células gigantes es muy bajo, entre un 2-5% de las células recuperadas. Sin embargo, esta proporción aumenta en modelos de infección crónica asintomática (Zaragoza *et al.*, 2010) o cuando se realiza una coinfección con cepas con alelos sexuales MATa y MATalpha (Okagaki *et al.*, 2010).

Las rutas implicadas en la formación de estas células no han sido aún caracterizadas aunque se conocen algunos elementos necesarios para su aparición. Por ejemplo, la síntesis de AMPc está

involucrada en la señalización que induce el crecimiento celular, ya que mutantes en la adenilato ciclasa no forman células gigantes (Zaragoza *et al.*, 2010). Recientemente, se ha descrito que Gpr5, que es un receptor acoplado a proteínas G, es necesario para la formación de células gigantes (Okagaki *et al.*, 2011).

La función de las células gigantes durante la infección no es conocida. Se ha descrito que podrían ser formas latentes que contribuyen a evadir la respuesta inmune y sobrevivir en el huésped de forma latente. Pero también podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad, ya que las células gigantes inhiben la fagocitosis de células de *Cryptococcus* de tamaño regular (Crabtree *et al.*, 2012; Okagaki y Nielsen, 2012).

Por último, los cambios de tamaño no sólo implican aparición de células más grandes, sino que *Cryptococcus* también puede formar células de un tamaño más pequeño, las cuales se han denominado microformas, y que tienen un diámetro de 1-2 micras. Aunque estas células se describieron en el año 2001 (Feldmesser *et al.*, 2001a), no se conoce ni su mecanismo de formación ni su función durante la infección.

8.- Interés de *Cryptococcus* como modelo de patogénesis fúngica

Cryptococcus constituye un modelo único para estudiar la patogénesis fúngica ya que posee tanto factores de virulencia (como la cápsula y la melanina) como múltiples mecanismos de adaptación al huésped. Dentro de estos mecanismos de adaptación, la morfogénesis de *Cryptococcus* es un mecanismo poco estudiado, ya que se trata de un programa no convencional que no implica formación de hifas pero sí cambios en la estructura y en el tamaño de la célula que dificultan su reconocimiento por el sistema inmune y favorecen su supervivencia en el huésped. Por ello, esta tesis doctoral está centrada principalmente en el estudio de la morfogénesis (crecimiento capsular y formación de células gigantes) en *Cryptococcus*.

Objetivos

Cryptococcus es uno de los principales hongos patógenos, y ofrece un modelo único para investigar la patogénesis fúngica, ya que ha desarrollado múltiples mecanismos de adaptación al huésped y factores de virulencia que producen daño en el huésped. El principal objetivo de esta tesis fue investigar el papel de la morfogénesis (crecimiento de la cápsula y formación de células gigantes) en *Cryptococcus*. Para ello, hemos intentado tanto identificar mecanismos moleculares involucrados en estos procesos, así como estudiar su importancia en el huésped. Para ello, hemos utilizado distintos tipos de huésped. Además del modelo clásico de ratón, hemos puesto a punto la utilización de larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* para el estudio de la morfogénesis de *Cryptococcus*. Hemos intentado también identificar genes y los mecanismos moleculares involucrados en estos cambios morfológicos. En concreto, nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Usar el modelo invertebrado de *Galleria mellonella* para estudiar la morfogénesis de *C. neoformans* durante la infección.
- 2.- Identificar nuevos genes involucrados en la síntesis o crecimiento capsular y la posible relación entre la progresión del ciclo celular y el crecimiento de la cápsula.
- 3.- Caracterización fenotípica de la formación de células gigantes/titanes en *C. neoformans* y *C. gatti*.
- 4.- Estudiar la interacción de células gigantes con el huésped

Material y métodos

1.- Cepas y condiciones de crecimiento de levaduras

1.1. Cepas de *Cryptococcus*

Las cepas utilizadas en este trabajo se encuentran descritas en la tabla 1. En la mayoría de los experimentos realizados se empleó la cepa de *C. neoformans* variedad *grubii* H99 (ATCC 20882) (Perfect *et al.*, 1980). En algunos experimentos se emplearon las cepas de *C. neoformans* variedad *neoformans* B3501 (Kwon-Chung, 1976) y el mutante acapsular *cap59* (C536, (Chang *et al.*, 1995)). En otros experimentos se empleó el mutante de *C. neoformans* CNAG_06092 (*cln1*), el cual fue obtenido de la colección de mutantes depositada en la ATCC (Liu *et al.*, 2008). Para la realización de los videos de la interacción de *C. neoformans* con macrófagos de la línea celular RAW264.7 o con macrófagos primarios peritoneales se empleó también la cepa de *C. neoformans* marcada con GFP que fue proporcionada por la Dra. Voelz y el Dr. May (Universidad de Birmingham, Inglaterra). Para la comparación de producción de células gigantes entre *C. neoformans* y *C. gattii* se utilizaron distintas cepas disponibles en la colección de levaduras del servicio de Micología del CNM (ver tabla 1).

1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras se obtuvieron de manera regular tras inocularlas en medio Sabouraud líquido (Oxoid, Reino Unido) a 30°C con agitación moderada (150 r.p.m) o en YPD (extracto de levadura 1% (Difco), peptona 2% (Difco), glucosa 2% (Prolabo)).

Para inducir el crecimiento capsular en *C. neoformans* las células se incubaron en Sabouraud diluido al 10% tamponado con MOPS 50 mM, pH 7,3 a 37°C durante una noche (Zaragoza y Casadevall, 2004), excepto en los casos en los que se indique otra temperatura.

Para inducir la melanización de las levaduras, las células se inocularon en medio mínimo (glucosa 15 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, glicina 13 mM y tiamina 3 µM, pH 5,5 ajustado con K₂HPO₄ 1M o ClH 1N) con o sin L-DOPA 0,2 mM (Sigma Aldrich) a 30°C. La melanización pudo observarse como colonias de color marrón oscuro.

Para la preparación de medios sólidos, se añadió 1,5% agar bacteriológico (Difco). Además, en otros casos, el medio sólido fue suplementado con Sorbitol 1M (Sigma), sulfato de amonio al 5% (Sigma) o Rojo Congo en distintas concentraciones (10 mg/mL, 5 mg/mL y 0,05 mg/mL).

Especie	Cepa	Fuente
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	H99 (ATCC 20882)	(Perfect <i>et al.</i> , 1980; Toffaletti <i>et al.</i> , 1993)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	B3501	(Kwon-Chung, 1976)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	C536 ($\Delta cap59$)	Chang YC <i>et al.</i> , 1995
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	ATCC 24067	(American Type Culture Collection, Manassas, VA)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CL-3801	Servicio Micología
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CL-4849	Servicio Micología
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CL-6749	Servicio Micología
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CL-7711	Servicio Micología
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CL-7081	Servicio Micología
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> -GFP		(Voelz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CNAG_06092	(Liu <i>et al.</i> , 2008)
<i>Cryptococcus gattii</i>	NIH 34	NIH, Bethesda, Maryland
<i>Cryptococcus gattii</i>	NIH 198	NIH, Bethesda, Maryland
<i>Cryptococcus gattii</i>	CL-5000	Servicio Micología
<i>Cryptococcus gattii</i>	CL-5002	Servicio Micología
<i>Cryptococcus gattii</i>	CL-5003	Servicio Micología
<i>Cryptococcus gattii</i>	CL-5004	Servicio Micología
<i>Cryptococcus gattii</i>	CL-5005	Servicio Micología
<i>Cryptococcus gattii</i>	CBS-10514 (R265)	(Kidd <i>et al.</i> , 2004)
<i>Cryptococcus gattii</i>	CBS-10865 (R272)	(Kidd <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 2: Listado de las cepas empleadas en este trabajo

2. *Inhibidores de ciclo celular*

En algunos experimentos, se emplearon rapamicina (Sigma-Aldrich) y benomilo (Sigma-Aldrich), que son compuestos que inducen parada del ciclo celular en G1 y M respectivamente. Ambos inhibidores se disolvieron en DMSO 99,9% (Sigma-Aldrich). La rapamicina se preparó a una concentración de 1 mg/mL y el benomilo se preparó a una concentración de 10 mg/mL. El benomilo no se disuelve a concentraciones superiores a 10 mg/mL. Una vez preparadas estas soluciones madre, se hicieron alícuotas y se conservaron a -20°C hasta su uso. La rapamicina se utilizó a concentraciones finales de 0,5 y 1 µg/mL, mientras que el benomilo se utilizó a 60 y 80 µg/mL.

3. *Técnicas microbiológicas*

3.1. *Curvas de crecimiento*

Para realizar curvas de crecimiento, se prepararon suspensiones de levaduras a una concentración de 5×10^5 células/mL y se inocularon por triplicado 170 µL en pocillos de placas de microdilución de 96 pocillos (Costar, Nueva York). La placa se incubó a 30 o 37°C en un espectrofotómetro iEMS (Thermofisher) que midió la densidad óptica a 540 nm cada hora durante 48 ó 72 h. Los datos se analizaron con Graph Pad Prism 5.

3.2. *Patrón de crecimiento en medios sólidos*

Se prepararon suspensiones celulares de 2×10^7 células/mL en PBS. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 en el mismo tampón y se depositaron 5 µL de cada una de ellas sobre placas de medio sólido. Las placas se incubaron 48 ó 72 h a 30 ó 37°C y se tomaron fotos diariamente para observar el perfil de crecimiento.

3.3. *Cuantificación de la actividad lacasa*

Las células se cultivaron en 15 mL de medio mínimo líquido con L-DOPA (Kwon-Chung *et al.*, 1983) durante una noche a 30°C con agitación (150 r.p.m) y protegido de la luz. Las células se lavaron con 2 mL de PBS y se repartieron en 2 alícuotas de 1 mL ($7,5 \times 10^6$ /mL); una de ellas se usó como control negativo inactivando la lacasa con 5% β- mercaptoetanol durante 2 h a 37°C. A continuación, se añadieron 200 µL de bolas de vidrio (425-600 µm de diámetro, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) y se realizó un extracto celular mediante agitación vigorosa en una máquina Fast Prep (MP Biomedicals). Para la rotura, se aplicaron 6 ciclos de 45 seg con intervalos de 4 min de incubación en hielo. La mezcla se centrifugó a 12.000 r.p.m (13800 g) en una centrifuga de mesa Biofuge Fresco (Heraeus) durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se mantuvieron a 4°C hasta la realización del ensayo enzimático.

Para medir la actividad lacasa, se depositaron 100 μ L de los sobrenadantes y 7 μ L de una solución de L-DOPA de 20 mM en agua destilada (Alvarado-Ramirez *et al.*, 2008) en una placa de 96 pocillos (Costar, Nueva York) por triplicado y se incubó a 25°C con agitación moderada en un espectrofotómetro iEMS (Thermofisher) durante 18 h donde se midió la densidad óptica a 450 nm cada 15 min. Después, en la parte lineal de la reacción, se calculó el incremento de mU de absorbancia por minuto. La concentración de proteína de los extractos se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando el kit Bradford Protein Assay (BioRad, München, Alemania). La actividad específica fue calculada como mUAbs/min/ μ g proteína.

3.4. Análisis del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno

Las células de *C. neoformans* se incubaron en medio mínimo líquido con L-DOPA (Eisenman *et al.*, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 1983) durante 24-48 h y tras lavar sucesivas veces con PBS se prepararon suspensiones a una densidad de 2×10^3 células/mL en el mismo tampón. A continuación se añadieron distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (0,5; 1 y 2 mM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). En paralelo, se prepararon como controles suspensiones celulares a las que no se añadió peróxido de hidrógeno. Todas las muestras se llevaron a cabo en triplicado. Las células se incubaron durante 1 h a 30°C, tras lo cual, 50 y 100 μ L fueron sembrados en placas de Sabouraud e incubadas a 30°C. Al cabo de 2 días, se enumeró el número de colonias en las placas (UFCs) y la viabilidad se calculó como el porcentaje de colonias obtenidas en las muestras tratadas con peróxido de hidrógeno frente al número de colonias obtenido en las no tratadas o controles.

3.5. Tinciones

3.5.1. Tinción negativa con tinta china

Para visualizar la cápsula, se depositaron 4 μ L de suspensiones celulares de *Cryptococcus* sobre un portaobjetos y se añadió una gota de tinta china (Remel Bactidrop, Lenexa, Kansas). Finalmente, se colocó un cubreobjetos de 24x40 mm de tamaño (Menzel-Gläser) sobre el porta, el cual se observó al microscopio. La cápsula de *Cryptococcus* se observó como un halo alrededor del cuerpo celular por la exclusión de la tinta china.

3.5.1.1. Medida de los tamaños celulares

Las preparaciones descritas anteriormente se observaron en un microscopio Leica DMI 3000B y se tomaron fotos usando una cámara Leica DFC 300FX y el software Leica Mycosystems. La medida del tamaño de la célula y de la cápsula se realizó utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, California). El tamaño total de la célula se definió

como el diámetro total de la célula incluyendo la cápsula. El tamaño de la cápsula se calculó como la diferencia entre el tamaño total de la célula y el tamaño del cuerpo celular definido por la pared celular.

3.5.1.2. *Análisis de la permeabilidad de la cápsula*

Se prepararon 100 μ L de suspensiones de levaduras en PBS a una concentración de 10^5 células/mL, y se mezclaron con una gota de tinta china y un dextrano marcado con tetrametilrodamina de 70 KDa a una concentración final de 3,6 μ g/mL (Molecular Probes, Eugene, OR). Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia, y se tomaron fotos en campo claro y en el filtro rojo (600 nm). En las fotos tomadas en campo claro, se midió el tamaño total y el del cuerpo celular. En las fotos fluorescentes, se determinó el área de la cápsula donde el dextrano no penetró. El índice de permeabilidad se calculó con estos dos parámetros como el porcentaje de capsula penetrada por el dextrano fluorescente en referencia al tamaño total de la cápsula.

3.5.2. Tinción de la pared celular

Para la tinción de la pared celular se utilizó en la mayoría de los experimentos Calcofluor (Sigma-Aldrich, St. Louis). Para ello, las células (5×10^6 células/mL) se incubaron durante 30 min a 37°C con Calcofluor a una concentración final de 10 μ g/mL. Transcurrido ese tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia. En algunos experimentos, la pared celular se marcó con Uvitex 2B (Reinehr and Rembold, Kandern, Germany). El Uvitex 2B se utilizó a una concentración final de 100 μ g/mL y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación las células se lavaron una vez con PBS, tras lo cual se observaron al microscopio de fluorescencia.

3.5.3. Inmunofluorescencia de la cápsula

Para visualizar la cápsula, se empleó inmunofluorescencia directa o indirecta. En ambos casos, se prepararon suspensiones de *C. neoformans* a una concentración de 5×10^6 células/mL en PBS. En la fluorescencia directa, se añadió el anticuerpo monoclonal IgG1 18B7 (Casadevall *et al.*, 1992a) conjugado al fluoróforo Alexa 488 a una concentración final de 10 μ g/mL durante 30 min a 37°C en oscuridad. Las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía albúmina bovina (BSA) al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y se incubaron con Uvitex 2B durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS+ BSA 1%. Finalmente, para reducir la pérdida de fluorescencia, las células se resuspendieron en el antioxidante galato de propilo a una concentración de 0,1 M (Sigma, St. Louis, Missouri) en PBS.

Para realizar inmunofluorescencia indirecta, en primer lugar se marcó la pared celular con calcofluor tal y como se describe en el apartado 3.5.2. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS + BSA 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Las levaduras se suspendieron en el mismo tampón y se incubaron con diferentes anticuerpos monoclonales (IgG1 18B7 o 2H1 y/o IgM 12A1 o 13F1 (Casadevall *et al.*, 1992a)) a una concentración final de 10 µg/mL durante 1 hora a 37°C. A continuación, las células se lavaron nuevamente con PBS + BSA 1% y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón IgG o IgM conjugado con FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) durante 1 hora a 37°C protegidas de la luz. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con PBS + BSA 1% y se suspendieron en PBS y tras colocar 5 µL sobre un porta, se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia.

3.5.4. Tinción de vacuolas

Para identificar las vacuolas en *C. neoformans*, se utilizó el marcador específico MDY-64 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las levaduras se suspendieron en tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) suplementado con glucosa al 5%. Se preparó una solución madre de 10 µM en DMSO 99,9% y se utilizó a una concentración final de 0,4 µM. Las levaduras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y a continuación se lavaron y resuspendieron en el mismo tampón. Finalmente, las células fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia confocal SP5 Leica Microsystems.

3.5.5. Tinción de filamentos de actina

Para observar los filamentos de actina de *Cryptococcus*, se preparó una suspensión de levaduras (200 µL) a una concentración de 10^7 células/mL en PBS y se tiñeron con Calcofluor tal y como se detalla en el apartado 3.5.2. Tras lavar 2 veces con PBS-BSA 1%, las células se fijaron con 500 µL de 4% paraformaldehído durante 40 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS + BSA 1% y se permeabilizaron con Tritón X-100 preparado al 0,3% en PBS en un volumen de 200 µL durante 1 minuto. Después, la suspensión de células se lavó con PBS-BSA 1% y se incubaron en este mismo tampón y en el mismo volumen durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se añadió Faloidina marcada con FITC (Invitrogen, Molecular Probes, Oregón) a una concentración final de 0,33 µM y el tubo se incubó durante 20 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente las células se lavaron 2 veces con PBS + BSA 1% y se observaron al microscopio de fluorescencia.

3.5.6. Tinción de grupos N-acetil-D-glucosamina de la cápsula con WGA (*Wheat Germ Agglutinin*)

Para observar la presencia de estructuras relacionadas con la quitina en la cápsula, se preparó una suspensión de levaduras en PBS (5×10^6 células/mL) y se fijaron con 4% paraformaldehído durante 40 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 μ L de PBS con WGA conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración final de 5 μ g/mL. Tras incubar 1 h a 37°C en oscuridad, las células se lavaron y resuspendieron en PBS y se observaron y analizaron en un microscopio confocal SP5 Leica Microsystems.

4. Técnicas de citometría de flujo

4.1. Análisis del contenido en ADN

Para medir la cantidad de ADN por citometría de flujo y estimar la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular, se tomaron alícuotas de un cultivo de *C. neoformans* en 10% Sabouraud en MOPS a pH 7,3 a distintos tiempos y se fijaron durante una noche en etanol al 70% a 4°C. El día siguiente las células se lavaron 2 veces con agua destilada y se resuspendieron en 2 mL de citrato sódico 20 mM (Sigma), EDTA 50 mM (Sigma) y Sorbitol 0,45 mM (Sigma) a pH 5,5. Las células se incubaron durante 1 hora a 30°C y a continuación se añadió RNasa (Sigma Aldrich, St. Louis) a una concentración final de 10 μ g/ml durante 2 h a 30°C. Finalmente se añadió ioduro de propidio (Sigma Aldrich, St. Louis) a una concentración de 5 μ g/ml. En paralelo se prepararon muestras sin ioduro de propidio como controles negativos. Las muestras así marcadas se observaron al microscopio de fluorescencia para comprobar la correcta tinción de los núcleos y el contenido de ADN fue analizado por citometría de flujo en un FACS Calibur (BD, Biosciences, Woburn, Massachusetts) midiendo la intensidad de fluorescencia en el canal FL3. Los datos obtenidos fueron analizados con los programas informáticos CellQuest (BD, Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, Oregon).

4.2. Análisis de la viabilidad de las células

Para comprobar la viabilidad de las células, se utilizó la tinción de ioduro de propidio, el cual sólo penetra en células muertas porque tienen la permeabilidad de la membrana alterada. Se prepararon diferentes alícuotas de 2 mL a una concentración de 5×10^6 células/mL en tampón citrato sódico 20 mM (Sigma), EDTA 50 mM (Sigma) y Sorbitol 0,45 mM (Sigma) a pH 5,5 y a continuación, se añadió ioduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración final de 5 μ g/mL. Las células muertas, que emitían fluorescencia roja por la captación del ioduro de propidio, se observaron con un microscopio de fluorescencia, y su proporción se estimó tras analizar las muestras mediante citometría de flujo. Como control positivo se utilizaron células de *C. neoformans* muertas por calor (65°C durante 1 hora). Los datos obtenidos del citómetro fueron

analizados con los programas CellQuest (BD, Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, Oregon).

5. Modelos de interacción con el huésped

5.1. Cultivos celulares

En esta tesis se han utilizado dos tipos de macrófagos diferentes: macrófagos inmortalizados y macrófagos primarios aislados de la cavidad peritoneal de ratones. Los macrófagos inmortalizados presentan como principal ventaja la posibilidad de mantenerlos en cultivo permanentemente. Estos macrófagos se dividen una vez cada 12 horas y su manejo es muy fácil. Los macrófagos primarios peritoneales son células muy diferenciadas, con lo que no se dividen y por ello no pueden mantenerse en cultivo.

5.1.1. Cultivos celulares de macrófagos de la línea celular RAW264.7

La línea celular de macrófagos RAW264.7 (Raschke *et al.*, 1978) deriva de macrófagos aislados de abscesos tumorales inducidos en ratones machos mediante inyección intraperitoneal del virus Abelson, responsable de la leucemia en ratones (A-MuLV). Las células crecieron en medio de cultivo completo compuesto por *Dubelcco's modified Eagle's medium* (DMEM, Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, HyClone-Perbio) inactivado por calor (30 min a 56°C), 10% de medio NCTC (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% CO₂. Las células se separaron cuando llegaron a ser confluentes formando una monocapa adherente.

5.1.2. Aislamiento de macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales primarios se aislaron de ratones machos (8-12 semanas) de las cepas C57BL/6J o CD1 (Charles River). Para ello, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, y en condiciones de esterilidad se abrió la cavidad abdominal y se hizo una pequeña incisión en el peritoneo con unas tijeras. A continuación se introdujo una pipeta Pasteur y se realizaron sucesivos lavados de la cavidad peritoneal con 2 mL de PBS suplementado con 1% de estreptomicina. Tras la centrifugación de la suspensión celular a 1000 r.p.m (1500 g) en una centrífuga Hermle z400K, se determinó la concentración de macrófagos usando un hemocitómetro y se prepararon suspensiones a 5×10^5 /mL en medio completo. Finalmente, se repartieron 200 µL en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos (Costar, Nueva York) el día anterior a la realización del experimento de fagocitosis.

5.1.3. Fagocitosis *in vitro*

Los macrófagos empleados en los ensayos de fagocitosis se prepararon el día anterior al experimento, y el procedimiento fue diferente según se usaron macrófagos de la línea celular RAW264.7 o macrófagos primarios peritoneales de ratón. Los macrófagos RAW264.7 fueron separados de las placas de cultivo mediante pipeteo continuo. Las células se centrifugaron a 1000 r.p.m (1500 g) en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) y el sedimento se resuspendió en 2 mL de medio completo fresco. La densidad celular se estimó tras recuento en un hemocitómetro y se prepararon suspensiones celulares a $2,5 \times 10^5$ células/mL. Después, se repartieron 200 μ L de esta suspensión por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (5×10^4 macrófagos por pocillo). Cada condición se realizó por triplicado. La placa fue incubada a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Los macrófagos de la línea celular RAW264.7 se dividen cada 12 horas, de modo que se estimó que tras la noche de incubación había alrededor de 10^5 macrófagos por pocillo. En contra, los macrófagos peritoneales primarios no tienen capacidad de dividirse, por lo que el día previo al experimento se aislaron tal y como se ha descrito anteriormente y se colocaron a una densidad de 10^5 macrófagos por pocillo.

El día del experimento se retiró el medio y se inocularon 200 μ L de una suspensión de *C. neoformans* de 10^6 células/mL preparada en medio de cultivo (alrededor de 2×10^5 levaduras por pocillo, lo que supuso una relación 2:1, levaduras:macrófagos) con 10 μ g/ml de anticuerpo monoclonal IgG1 18B7 (Casadevall *et al.*, 1992b). La fagocitosis se llevó a cabo durante 2 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

5.1.4. Cuantificación de la fagocitosis mediante tinción con Giemsa

Para cuantificar la fagocitosis, se realizó una tinción con Giemsa de los macrófagos tal y como se describe en (Zaragoza *et al.*, 2003b). Tras la fagocitosis (ver apartado 5.1.3), se retiró el medio y se añadieron 100 μ L de metanol frío a cada pocillo. Trascurridos 30 min, se retiró el metanol y se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ L de PBS. A continuación se añadieron 50 μ L de una dilución 1:20 de solución Giemsa comercial (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente se retiró la solución de Giemsa, se lavaron los pocillos con PBS y se añadieron 100 μ L de este tampón a cada pocillo. Se tomaron 5 fotos por pocillo utilizando un microscopio invertido. En las fotografías se contaron alrededor de 50 macrófagos, y se enumeraron aquellos que contenían células de *Cryptococcus* en su interior. El índice de fagocitosis se calculó como el número de macrófagos infectados/número de macrófagos total x 100.

5.1.5. Análisis y cuantificación de citoquinas

Para analizar la producción de citoquinas de macrófagos peritoneales primarios expuestos a *Cryptococcus*, se realizaron ensayos de fagocitosis tal y como se han descrito anteriormente. La placa de microdilución se incubó durante toda la noche a 37°C en una atmósfera enriquecida con CO₂ al 5%. Al día siguiente el contenido de los pocillos se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó 10 min a 12000 r.p.m (13800 g) en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos eppendorf, los cuales se conservaron a -20°C hasta el día de su análisis. En paralelo se recogieron sobrenadantes de pocillos que únicamente contenían macrófagos no infectados como control.

El análisis de citoquinas se llevo a cabo con el reactivo Milliplex Map Kit Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel (Millipore, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas en un Luminex 200 (Biorad) con el software Bioplex (Biorad). Las gráficas y el análisis estadístico se llevo a cabo con Graph Pad Prism 5.

5.2. Modelo de ratón

5.2.1. Infección intratraqueal

Se emplearon ratones CD1 machos de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratories). Las distintas cepas de *C. neoformans* se inocularon en Sabouraud líquido a 30°C con agitación moderada (150 r.p.m) el día previo al experimento. El día de la infección, se recogió 1 mL de los cultivos de levadura y tras lavarlo 2 veces con 1 mL de PBS, el sedimento de células se resuspendió en 1 mL de este mismo tampón. A continuación se estimó la concentración celular con un hemocitómetro o un contador automático de células (Bio-Rad TC10) y se prepararon suspensiones de levadura a una concentración de 2×10^6 células/mL en PBS. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal usando una mezcla de xilacina/ketamina. La mezcla se preparó con xilacina comercial Xilagesic 2% (Calier) y ketamina Imalgene 1000 (Merial). La xilacina se utilizó a una concentración de 5 mg/mL y la ketamina a una concentración de 2 mg/mL en PBS. Se calculó que el número de microlitros a inyectar fuera el resultado de multiplicar el peso del ratón en gramos por diez más 100. De esta manera los ratones recibieron una dosis de xilacina de 25-35 mg/kg y de ketamina de 70-90 mg/kg. Para realizar la infección intratraqueal, se esterilizó la piel con etanol al 70% y se realizó un pequeño corte a la altura de la tráquea. Una vez localizada la tráquea se inyectaron 50 µL con una jeringuilla de 1 mL y unas agujas de 30G. Para todos los experimentos con ratones se siguieron los protocolos aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III (PA50-2008 y PA50-2011-v2).

5.2.2. Aislamiento de las células de *Cryptococcus* del pulmón

Para aislar las levaduras de los ratones, se realizaron infecciones tal y como se ha descrito en el apartado anterior, y al cabo 2-3 semanas, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los pulmones fueron extraídos en condiciones de esterilidad y se colocaron sobre filtros de 100 μm (BD Falcon), situados en placas petri con 10 mL de colagenasa a 1 mg/mL (Roche, Mannheim, Alemania) preparada en PBS. Los pulmones se homogeneizaron con la ayuda de un émbolo de una jeringa de 20 mL. Se añadió estreptomicina al 1% a todas las soluciones y tampones con el fin de evitar contaminaciones bacterianas durante todo el proceso de purificación. El homogeneizado fue incubado a 37°C durante 90 min con agitación cada 15-20 minutos con vortex para facilitar la disgregación del tejido. A continuación, la suspensión se lavó 3 veces con agua destilada estéril para explotar y eliminar las células del ratón y las levaduras se suspendieron finalmente en PBS.

5.2.3. Aislamiento de las células gigantes de *Cryptococcus*

En algunos experimentos, se separaron las células gigantes de las células de tamaño normal mediante filtración utilizando filtros con un tamaño de poro de 20 μm . En este sistema, se ha comprobado que las células quedan retenidas en el filtro según el tamaño del cuerpo celular delimitado por la pared celular, y no por el tamaño de la cápsula, ya que al ser una estructura hidratada y flexible no tiene la rigidez suficiente para retener las células en el filtro. Las células retenidas en el filtro con un cuerpo celular mayor de 20 μm tuvieron siempre un tamaño total mayor de 30 μm al incluir el tamaño de la cápsula. Las células recuperadas tal y como se ha descrito en el punto 5.2.2. se filtraron a través de filtros de 20 μm (Millipore, Irlanda) utilizando un sistema de filtración de vidrio de un diámetro de 25 mm acoplado a un kitasato de 100 mL (Millipore, Irlanda) y conectado a una bomba de vacío. Para separar las células gigantes, los filtros se sumergieron en 20-30 mL de PBS en tubos de 50 mL (Falcon) y se mantuvieron con agitación suave durante al menos 10 minutos. A continuación se sacaron los filtros del tubo con la ayuda de unas pinzas y se centrifugó 5 minutos a 2.500 r.p.m (3500 g) (Hermle Z400K). Finalmente, se retiró el PBS y las células se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón para su posterior análisis.

5.3. *Modelo de Galleria mellonella*

5.3.1. Infección de las larvas

Las larvas de *Galleria mellonella* empleadas (Mous Livebait R.J., Holanda y Alcotán, Valencia) fueron seleccionadas por su peso (entre 0,2 y 0,4 g) y por no presentar marcas oscuras en su cutícula. Las larvas fueron limpiadas con un hisopo empapado en etanol al 70%. La inoculación se realizó a través de la última propata derecha de la larva con una

jeringuilla Hamilton con una aguja de 26G. Las jeringuillas fueron lavadas previamente con lejía diluida al 10% seguido de etanol al 70% y PBS estéril. Para realizar infecciones, las larvas se inocularon con 10 μ l de una suspensión de *Cryptococcus* preparada a distintas densidades (desde 10^4 a 10^8 células/mL) en PBS con ampicilina a una concentración 2 μ g/ml.

5.3.2. Experimentos de supervivencia

Se inocularon 10-20 larvas por grupo tal y como se ha explicado en el punto 5.3.1. Tras la inoculación, las larvas fueron incubadas en placas de petri de 90 mm (Soria genlab, S.A., Madrid) a 37 y/o a 30°C y el número de larvas muertas fue anotado diariamente. En paralelo, un grupo de larvas fue inoculado con ampicilina (2 μ g/mL) preparada en PBS como control del daño producido por la inyección y otro grupo de larvas sin ningún tipo de manipulación fue llevado en paralelo como control del estado de salud de las larvas. Las curvas de muerte fueron realizadas con el programa Graph Pad Prism 5 (La Jolla, California). Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces obteniendo siempre resultados similares. Las gráficas que se muestran corresponden a un experimento representativo.

5.3.3. Recuperación de levaduras de larvas infectadas

Para recuperar las células de *Cryptococcus* de *G. mellonella*, las larvas se trituraron con la ayuda de filtros de 100 μ m de poro (BD, Falcon, Erembodegrem, Bélgica) y émbolos de jeringas de 20 mL (BD Plastipak, Madrid) tras distintos tiempos de infección. El homogeneizado fue recogido en 1 mL de PBS, lavado 2 veces con 500 μ L de PBS y resuspendido en 150 μ L del mismo tampón. A continuación se depositaron 4 μ L de la suspensión sobre una gota de tinta china y se observaron y fotografiaron con un microscopio Leica DMI 3000B (Leica Microsystems).

5.3.4. Fagocitosis in vivo

Para visualizar la fagocitosis *in vivo* en *G. mellonella*, se inyectaron células de *Cryptococcus* marcadas con Calcofluor para facilitar su visualización. Para ello, se preparó una suspensión de levaduras a una concentración de 10^8 células/mL en PBS y se añadió 10 μ g/ml de Calcofluor (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) durante 30 min a 37°C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en el mismo volumen del mismo tampón. A continuación se inocularon 10 μ L de levaduras a grupos de 3-5 larvas tal y como se ha descrito en 5.3.1 y se incubaron 2 h a 37°C. Transcurridas las 2 h, se extrajo la hemolinfa de las larvas tras realizar una pequeña incisión con un bisturí en la parte ventral inferior de las larvas. La hemolinfa se recogió en tubos

eppendorf con 100 µl de tampón antimelanizante y anticoagulante IPS (*Insect Physiological Saline*: Cloruro Sódico 150 mM, Cloruro Potásico 5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 6,9; EDTA 10 mM y Citrato Sódico 30 mM) o PBS frío. Las muestras se centrifugaron a 1000 r.p.m (1500 g) en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) durante 5 min con el fin de separar los hemocitos de la fracción humoral. El precipitado correspondiente a los hemocitos fue resuspendido en 200 µL de tampón IPS y se colocaron 5 µL sobre cubreobjetos de vidrio, donde se mantuvieron en oscuridad 40 min a temperatura ambiente para permitir la adhesión de los hemocitos al vidrio. A continuación, los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos con una gota de Fluoromount G (SouthernBiotech) y se dejaron fijar durante 10 min antes de ser observados al microscopio de fluorescencia. Se realizaron recuentos de hemocitos con células de *Cryptococcus* en su interior y se calculó el índice de fagocitosis como el porcentaje de hemocitos con *Cryptococcus* en su interior con respecto al total de hemocitos contado. El resultado se expresó como la media obtenida del índice de fagocitosis de todas las larvas del mismo grupo. Los experimentos se realizaron por triplicado en distintos días.

5.3.5. Determinación de la densidad de hemocitos en la hemolinfa.

Una de las respuestas de *G. mellonella* tras la infección está basada en un aumento de la cantidad de hemocitos en la hemolinfa. Por ello, se determinó la densidad hemocitaria de las larvas tras la inoculación de *Cryptococcus*. Para ello, se inocularon grupos de 10 larvas como se ha descrito en el punto 5.3.1 y tras 2 horas de incubación a 37°C, se extrajo la hemolinfa tras realizar una incisión en la zona ventral de la larva. La hemolinfa fue recogida en tubos de 1,5 mL e inmediatamente diluida 20 veces en tampón IPS frío para prevenir su melanización, minimizar su coagulación y facilitar el recuento en un hemocitómetro. Los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar de los datos obtenidos de las 10 larvas inoculadas en el mismo grupo. Las determinaciones se realizaron en 3 experimentos independientes en días distintos.

5.3.6. Preparación de extracto total de *Galleria mellonella* y separación de fracciones polares y apolares.

En algunos experimentos se obtuvieron extractos de *G. mellonella* (totales, polares y apolares) para investigar su efecto sobre el crecimiento capsular de *Cryptococcus in vitro*. Para ello, se trituraron 30 larvas en 20 mL de PBS con la ayuda de varios filtros tal y como se explica en el apartado 5.3.3. El extracto se pesó en un tubo universal y se centrifugó a 2500 r.p.m (3500 g) en una centrífuga Hermle z400k durante 5 min. El extracto total se obtuvo tras filtrar el sobrenadante a través de filtros de 0,22 µm (Millex, Cork, Irlanda). Para obtener la fracción polar lipídica, se siguió el protocolo descrito en (Chrisman *et al.*, 2011).

El extracto total se incubó con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1) durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 2500 r.p.m (3500 g) en una centrifuga Hermle z400k para conseguir la separación de fases. La fase superior se repartió en 10 tubos de 1,5 mL (100 µL por tubo) que se llevaron a una centrifuga de vacío DyNA Vap (Labnet) para proceder a su deshidratación. El precipitado se resuspendió en 100 µL de PBS y finalmente las muestras se conservaron a 4°C hasta su utilización.

6. Microscopía

6.1. Microscopía de campo claro y epifluorescencia

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DMI 3000B (Leica Microsystems) o bien un Olympus IX70 (Olympus America) para la observación de muestras y adquisición de imágenes en campo claro y fluorescencia. Los programas utilizados fueron LAS AF (Leica Microsystems) y QCapture Suite V2.68.6 (QImaging, Burnaby BC, Canada) respectivamente. Todas las fotografías fueron adquiridas con objetivos 40x (seco; 0.6) o 63x (aceite; 1,25) y procesadas con Adobe PhotoShop 7.0 (La Jolla, California).

6.2. Microscopía confocal

En algunos casos, las muestras se visualizaron en un microscopio confocal SP5 (Leica Microsystems) utilizando el software LAS AF (Leica Microsystems). Las imágenes se procesaron con los programas ImageJ (NIH) (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y Adobe PhotoShop 7.0 (La Jolla, California).

6.3. Microscopía electrónica de barrido

Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en solución de fijación (2% paraformaldehído, 2,5% glutaraldehído y cacodilato sódico 0,1 M). A continuación las células fueron deshidratadas sucesivas veces con etanol y recubiertas con paladio oro y visualizadas en un microscopio electrónico JEOL JAM 6400 (Tokyo, Japón).

6.4. Microscopía en tiempo real

Para la realización de los videos se utilizaron dos tipos de microscopios: un microscopio de fluorescencia Leica CTR 4000 o un microscopio confocal SP5 Leica Microsystems con objetivo Nomarski, y platina monitorizada que nos permitió realizar varios videos en paralelo. Para ello se utilizaron placas de microdilución con fondo de plástico en el caso del microscopio de fluorescencia Leica CTR 4000 o con fondo de cristal (Mat Tek Corporation, Ashland, MA, USA) cuando se utilizó el microscopio confocal SP5. En todos los casos las placas multipocillo se

incubaron en una cámara acoplada al microscopio que permitió incubar a una temperatura determinada y mantener la placa en una atmosfera con un 5% de CO₂ cuando fue necesario. En todos los casos se tomaron fotos cada 3-5 min durante un máximo de 18 h. Los videos se generaron con el software LAS AF (Leica Microsystems) y fueron procesados con ImageJ (NIH) (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y Adobe PhotoShop 7.0 (La Jolla, California).

7. Técnicas de biología molecular

7.1. Obtención y cuantificación de ADN genómico de *Cryptococcus*

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un cultivo de una colonia de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* en 5 mL de YPD líquido (BD Difco, Nueva Jersey) a 30°C. El cultivo se incubó durante 24 horas y se transfirió a un tubo universal de 25 mL. Las suspensiones se centrifugaron a 2500 r.p.m (3500 g) en una centrífuga Hermle z400k durante 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis (Triton X100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). La suspensión se transfirió a un tubo con tapa de rosca de 2 mL y se añadieron 500 mg de bolas de vidrio (425-600 µm de diámetro, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) y 500 µL de fenol-cloroformo isoamílico (Sigma-Aldrich, St. Louis). Las células se rompieron mediante agitación vigorosa en un Fast-Prep-24 (M.P. Biomedicals) (dos ciclos de 45 seg a la máxima velocidad con intervalos de 2 min en hielo). A continuación, los extractos se centrifugaron a 12000 r.p.m (13800 g) en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) durante 10 min y se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un tubo de 2 mL. Se añadieron 800 µL de etanol absoluto y se centrifugó nuevamente a 12000 r.p.m durante 10 min. A continuación, el precipitado se resuspendió en 400 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Para eliminar el ARN, se añadió 2 µL de una solución madre de RNAsa A a una concentración de 10 µg/mL y se incubó durante 5 min a 37°C. Finalmente, se añadieron 10 µL de acetato de amonio 5 M y 1 mL de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Para favorecer la precipitación, el tubo se incubó a -20°C durante una noche. Finalmente, se centrifugó a 13000 r.p.m durante 5 min y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Tras eliminar el sobrenadante con una pipeta, se dejó secar el tubo para eliminar los restos de etanol, y el precipitado se disolvió finalmente en 50 µL de Tampón EB (Tris 10 mM pH 8,5 Qiagen).

La cuantificación del ADN genómico se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un espectofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

7.2. Diseño de los cebadores

El diseño de los oligonucleotidos se realizó tal y como se describe en (Moyrand *et al.*, 2007). Los oligonucleotipos (Sigma) se disolvieron en agua MilliQ a una concentración de 100 µM. En la tabla 1 se muestra la secuencia de los oligonucleotidos utilizados en este trabajo.

Nombre Oligonucleótido	Secuencia 5'3'
NEOCLN1r	AAGACGTTGAGGAGACCTGCTCCAGGAAACAGCTATGAC
NEOCLN1	GTCATAGCTGTTTCCTGGAGCAGGTCTCCTCAACGTCTT
CLN1MKRf	ACTCGACATCGCTTCACGTTACCAGGAAACAGCTATGAC
CLN1-3'3	AAGTATCACCGTCCAGTTCGTG

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la PCR de fusión. En rojo aparece la secuencia que forma parte del marcador tanto en NEOCLN1r como en NEOCLN1

7.3. Construcción de ADN recombinante mediante PCR de fusión

Para reconstituir el mutante *cln1*, se fusionó el gen silvestre al marcador NEO que codifica la neomicina fosfotransferasa II (nptII) y que le confiere resistencia a la neomicina y geneticina (o G418). El gen *CLN1* se amplificó a partir del ADN genómico de *Cryptococcus neoformans* variedad *grubii* obtenido según se ha descrito en el apartado 7.2. El fragmento NEO se amplificó a partir del plásmido pPZP-NEO1 (Walton *et al.*, 2005) (Figura 2).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µL, que contenía 1X Tampón Phusion HF (Finnzymes), 0,5 mM de dNTPs (Applied Biosystems), oligonucleótidos específicos para la amplificación a una concentración final de 0,1 µM (MKRf y NEOCLN1r para el fragmento NEO; y NEOCLN1 y CLN1-3'3 para el fragmento CLN1), 1 unidad de ADN polimerasa Phusion (Finnzymes) y 50 ng de ADN molde (genómico en el caso del fragmento CLN1 y plasmídico para el fragmento NEO) (Figura 2).

La amplificación se llevo a cabo en un termociclador (Biorad, MyCycler Thermal Cycler) con un programa de un ciclo de 30 seg a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 seg a 98°C, y 5 min a 72°C y por último un ciclo de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 0,8%. Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó el marcador 1Kb (Promega). Por último, los geles se tiñeron mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos, y se visualizaron en un transiluminador conectado a un equipo de captación de imágenes (GelDoc 2000, BioRad). Para purificar los fragmentos, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8%. Las bandas correspondientes a los fragmentos se visualizaron tras colocar el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta, y se recortaron con la ayuda de un bisturí. La purificación del ADN de la agarosa se realizó con el kit QIAquick Gel extraction (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. A continuación se cuantificó la cantidad de cada fragmento midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

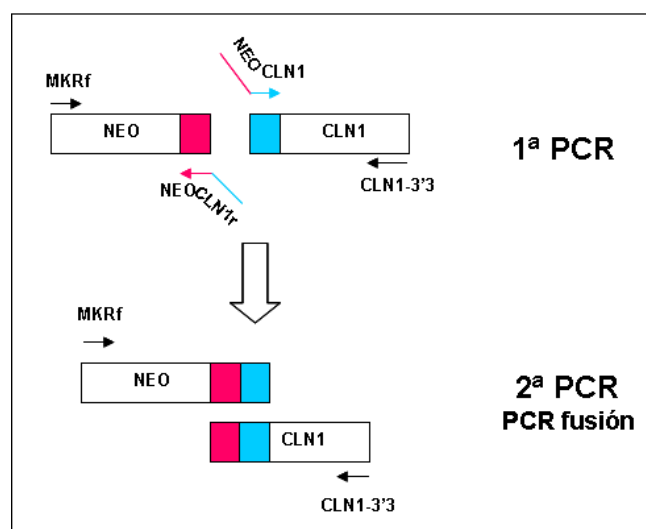


Figura 2: Esquema de la construcción del ADN recombinante. En la parte superior se muestran los productos amplificados mediante PCR de forma independiente. En la parte inferior se muestra un esquema de la PCR de fusión.

Para realizar la PCR de fusión, se tomaron 50 ng de cada fragmento y se utilizaron como molde en la segunda reacción que se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito para los fragmentos individuales, pero utilizando como cebadores los oligonucleótidos MKRf y CLN1-3'3 (Figura 2). Tras la PCR de fusión, los fragmentos fueron visualizados y purificados tal y como se ha descrito anteriormente.

7.4. Transformación biolística

La transformación biolística es el método más eficiente para transformar *C. neoformans*, ya que otras técnicas, como la transformación con sales de litio y el choque térmico o la electroporación tienen rendimientos muy bajos y dan lugar a reordenaciones genómicas (Varma y Kwon-Chung, 1994). La transformación biolística consiste en la inyección en las levaduras de bolas de oro de pequeño diámetro recubiertas con el ADN que se quiere integrar utilizando un sistema de inyección a vacío que “dispara” las bolas dentro de las levaduras. La transformación biolística se realizó durante una estancia de tres meses en el laboratorio del Dr. Janbon del Instituto Pasteur, según el protocolo descrito en (Moyrand *et al.*, 2004).

7.4.1. Preparación de las bolas de oro

Se pesaron 60 mg de bolas de oro de 0,6 μm (Biorad) en un criotubo de 1,5 mL, y se les añadió 1 mL de etanol absoluto. La mezcla se agitó en un vortex a máxima velocidad durante 3 min y a continuación se centrifugó 1 min a 13000 r.p.m (12000 g) en una centrífuga mini Spin Eppendorf (Biotek). Tras eliminar el sobrenadante, las bolas se lavaron

2 veces en 1 mL de agua destilada estéril y finalmente se conservaron a temperatura ambiente en 1 mL de agua destilada estéril hasta su uso.

7.4.2. Preparación de las muestras

Para cubrir las bolas con el producto de PCR, se tomaron 70 μ L de la suspensión de bolas tras agitarlas vigorosamente durante 3 min en un vortex y se dejaron decantar en un tubo de 1,5 mL. Tras retirar los 20 μ L superficiales del sobrenadante, se añadieron 10 μ L del ADN de fusión (obtenido tal y como se explica en el punto 7.3), 50 μ L de 2,5 M CaCl_2 frío (Sigma) y 10 μ L de Espermidina 1M fría (Sigma). La mezcla se agitó durante 10 min en un vortex. A continuación se dejó sedimentar las bolas en la poyata durante 3 min y se procedió a realizar los lavados. Primero se centrifugó 45 seg a 13000 r.p.m (12000 g) en una centrífuga mini Spin Eppendorf (Biotek), se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 500 μ L de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente y tras retirar el sobrenadante se añadieron 500 μ L de etanol absoluto y se centrifugó una vez más. Finalmente se retiró el sobrenadante y las bolas se resuspendieron en un volumen final de 50 μ L de etanol absoluto.

Este protocolo se realizó en paralelo con una suspensión de bolas a las que no se les añadió ADN como control negativo.

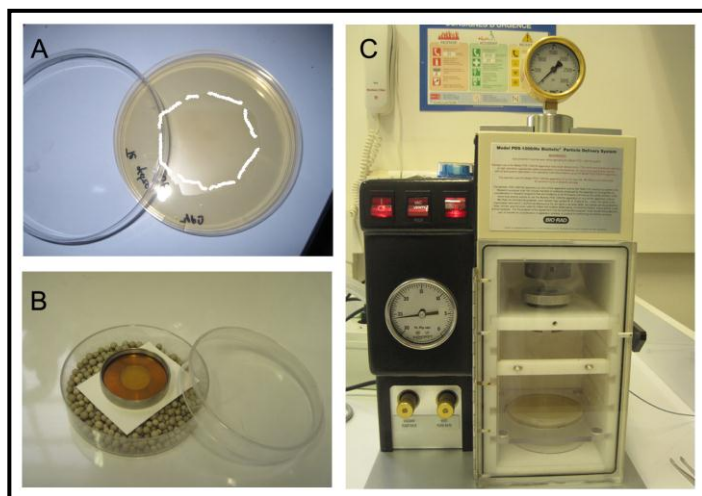


Figura 3. Trasformación biolística. (A) Siembra en forma de estrella de las levaduras **(B)** Macrocarrier (pieza metálica) con microcarrier ajustado (lamina color cobre) donde se colocan las bolas de oro recubiertas con el ADN. El macrocarrier se coloca sobre papel absorbente y silica para conseguir que se seque por completo antes de su utilización **(C)** Disparador de partículas de Biorad modelo PDS-1000 utilizado para la transformación biolística

7.4.3. Preparación de las células

Se inoculó una colonia del mutante *cln1* en 100 mL de YPD líquido con agitación a 30°C durante la noche. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 4000 r.p.m y el precipitado se resuspendió en 5 mL de tampón de regeneración (D-Sorbitol 1M (Sigma), D-Manitol 1M (Panreac), YNB sin aminoácidos 0,9% (BD), Glucosa 2,6% (Sigma), extracto de levaduras

0,0267% (BD), Peptona 0,054% (BD) y Gelatina 0,133% (Sigma)). A continuación se tomaron 200 μ L de dicha suspensión y se colocaron en forma de estrella en el centro de placas de 90 mm de YPD sólido (ver Figura 3 A) y se dejó secar por completo en una campana.

7.4.4. Transformación biolística

La transformación biolística se realizó con un disparador de partículas de Biorad modelo PDS-1000 utilizando discos de ruptura de 1100 psi (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron 4 disparos, uno en cada placa. Además, se realizó un disparo en otra placa con bolas no cubiertas de ADN como control negativo.

Las bolas recubiertas con el ADN se depositaron en los macrocarriers que se insertaron en los soportes ("macrocarriers Holders") y se acoplaron a la cámara de disparo (Figura 3 B, C).

Realizados los disparos, las placas se incubaron 4 h a 30°C y a continuación se recogieron las levaduras lavando el agar con 800 μ L de PBS estéril mediante sucesivos pipeteos o con ayuda de un asa de siembra. Finalmente, se tomaron alícuotas de 200 μ L y se sembraron en cuatro placas de YPD suplementado con Geneticina (200 μ g/mL). Se sembraron 4 placas por cada placa de disparo. Las placas se incubaron a 30°C durante 2-5 días.

7.5. Comprobación de la incorporación del ADN de fusión

Las colonias obtenidas en el apartado anterior se aislaron y se purificaron tras sembrarlas de nuevo en placas de YPD sólido con Geneticina (200 μ g/mL) y de ahí se transfirieron a YPD líquido durante 24 horas a 30°C con agitación para proceder a la extracción de ADN genómico tal y como se describió en el punto 7.1.

La integración del gen silvestre en el mutante *cln1* se comprobó mediante PCR usando los oligonucleótidos NEOCLN1 y CLN1-3'3. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 μ L, que contenían PCR Buffer II 1x (Applied Biosystems), $MgCl_2$ 2 mM, dNTP mix (Applied Biosystems) 0,5 mM, los oligonucleótidos a una concentración final de 0,1 μ M (NEOCLN1 y CLN1-3'3), 1,25 unidades de AmpliTaq ADN polimerasa y 50 ng de ADN genómico. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Biorad, MyCycler Thermal Cycler) con un programa de un ciclo de 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 15 seg a 95°C, y 5 min a 68°C y por último un ciclo de 7 min a 68°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 0,8% (Figura 3). Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó el marcador 1 Kb (Promega). Por último los geles se tiñeron mediante inmersión en bromuro de etidio a 0,5 μ g/mL durante 15 minutos, y se visualizaron en un transiluminador conectado a un equipo de captación de imágenes (GelDoc 2000, BioRad). Como control negativo se empleó ADN genómico de la cepa mutante *cln1* y como control

positivo ADN genómico de la cepa silvestre de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99 (Figura 4)

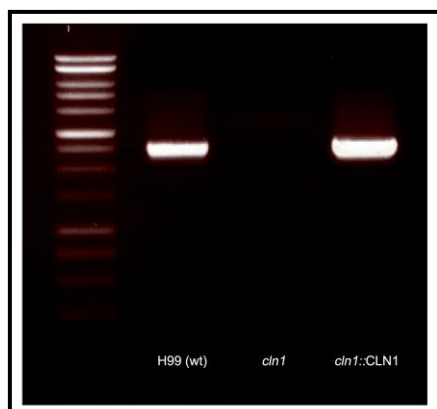


Figura 4. Gel de agarosa 0,8% donde se muestra el producto de PCR resultado de la amplificación del gen *CLN1* en la cepa silvestre (H99), en la cepa mutante de ciclina (*cln1*) y en la cepa reconstituída (*cln1::CLN1*).

8. Técnicas de proteómica

8.1. Preparación y cuantificación de extractos de proteínas

Para investigar las diferencias en los perfiles de proteínas entre el mutante *cln1* y la cepa silvestre, se realizaron estudios de proteómica. Para ello, células de estas dos cepas se inocularon en 10 mL de Sabouraud líquido y tras una noche de crecimiento a 30°C, se transfirieron a 50 mL de medio de inducción de la cápsula (10% Sabouraud tamponado con MOPS 50 mM a pH 7,3) a una concentración de 10^7 células/mL. Tras 6 horas de incubación a 30°C, los cultivos se centrifugaron durante 10 min a 2500 r.p.m y el precipitado se resuspendió en 2 mL de Tampón de lisis de proteínas (EDTA 5 mM, 1x de un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, Indianapolis) en tampón TE (10 mM Tris HCl pH 8, EDTA 1mM)). A continuación dicha suspensión se separó en alícuotas de 1 mL en 2 tubos de rosca de 2 mL. A esta suspensión se le añadieron 500 mg de bolas de vidrio de 425-600 μ m de diámetro (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) y se agitaron vigorosamente en un Fast-Prep. Para la rotura, se realizaron 6 ciclos de 20 seg a máxima velocidad con intervalos de 4 min en hielo. Finalmente los tubos se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos.

La cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando el kit Bradford Protein Assay (BioRad, München, Alemania). Para obtener una recta de calibración, se utilizó albúmina bovina (0, 2, 4, 6, 8 y 10 microgramos por pocillo).

8.2. Geles DIGE y análisis

Las muestras de proteínas fueron analizadas en el servicio de Proteómica de la UCM-UPM (miembro de la red ProteoRed-ISCI). Las muestras se purificaron con el reactivo de limpieza

2D-Clean Up (GE Healthcare). La cuantificación por Bradford fue confirmada por SDS-PAGE al 10% y teñido con Azul de Coomassie coloidal.

A continuación se realizó una mezcla de las 4 replicas de cada muestra con 100 µg de proteína y se realizaron los geles 2D-PAGE. Para visualizar las proteínas, los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie Coloidal (CCB) y posteriormente escaneados. La mitad de las réplicas biológicas por condición fueron marcadas con Cy3 y la otra mitad con Cy5. A continuación se escanearon los geles en un escáner de fluorescencia (Typhoon Trio, GE, Healthcare) utilizándose los filtros de excitación/emisión correspondientes a cada fluorocromo (Cy3: 532/580, Cy5: 633/670 y Cy2:488/520 nm de longitud de onda). Los geles DIGE, una vez escaneados con el escáner de fluorescencia, se tiñeron con Coomassie coloidal.

Las imágenes obtenidas del escáner Typhoon Trio fueron recortadas usando el software ImageQuant v5.1 (GE Healthcare) e importadas a la base de datos de Oracle que posee el software DeCyder v6.5 (GE Healthcare). Tras realizar el emparejamiento de las manchas de forma automática, se repasó y/o modificó aquellos emparejamientos que no fueron realizados correctamente de forma manual. A las manchas proteicas así seleccionadas se les aplicó distintos tratamientos estadísticos como el análisis de componentes principales y el análisis de agrupamiento jerárquico para obtener así el número definitivo de proteínas para identificar mediante espectrometría de Masas con un 4800 MALDI TOF/TOF. La identificación de los picos se realizó en la base de datos NCBI con restricción taxonómica en *yeast*.

9. Técnicas bioinformáticas

9.1. Identificación de genes que codifican posibles ciclinas de G1/S de *Cryptococcus* por homología de secuencia con Cln1 de *Ustilago maydis*.

La secuencia de la proteína Cln1 de *Cryptococcus neoformans* se identificó por homología con la proteína Cln1 de *Ustilago maydis* (Castillo-Lluva y Perez-Martin, 2005). Esta levadura es un basidiomiceto patógeno de plantas en el cual el ciclo celular ha sido caracterizado por el grupo del Dr. José Pérez Martín. La secuencia de esta proteína se utilizó para hacer una comparación con las proteínas de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (cepa H99) depositada en la base de datos de Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html). De esta manera, se identificó el marco abierto de lectura (open reading frame, ORF) CNAG_06092, que ya estaba anotado como una ciclina. Posteriormente a nuestra identificación, esta proteína ha sido caracterizada a nivel funcional como una ciclina de G1/S en *C. neoformans* por el grupo del Dr. Takeo en Chiba, Japón (Virtudazo *et al.*, 2010) y en consecuencia se ha denominado definitivamente como Cln1.

9.2. Identificación de genes únicos en *Cryptococcus neoformans* y genes con origen filogenético común a genes CAP

En colaboración con el grupo del Dr. Gabaldón del Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona), se realizaron comparaciones genómicas con el objeto de identificar genes involucrados en la síntesis de la cápsula. Para ello, se identificaron genes de *Cryptococcus neoformans* que cumplieran con estas dos premisas: (1) *Cryptococcus neoformans* es la única levadura que tiene cápsula, por ello identificamos genes presentes en *Cryptococcus* y no en otros hongos, ya que entre ellos deben existir algunos involucrados en la síntesis y/o ensamblaje de la cápsula. (2) Los genes que evolucionan de forma conjunta suelen tener funciones similares (Chen y Jeong, 2000; Gabaldon, 2008), por ello decidimos buscar genes que hubieran evolucionado de forma conjunta a genes ya conocidos involucrados en la síntesis de la cápsula de *Cryptococcus*, como son los genes CAP. Se escogieron CAP59 y CAP10 ya que tienen un perfil muy parecido, y básicamente indican presencia general en el género pero con pérdidas totales en Zygomycota, Taphrinomycota y Saccharomycotina.

En primer lugar se compararon 60 proteomas de hongos, incluyendo levaduras y hongos filamentosos, con el proteoma de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Anexo 1, ver tabla 4 en Resultados) y se definieron los “orfans”, es decir, proteínas de *C. neoformans* que no tuvieran identidad con un valor $E < 10^{-5}$ con proteínas de otros hongos. A continuación identificamos qué mutantes carentes de dichas proteínas estaban disponibles en la colección de mutantes de *C. neoformans* depositada en la ATCC y disponible en nuestro laboratorio (ver Anexo 2). Para la identificación de proteínas con origen filogenético común a Cap59/10, se realizó la misma comparación de proteomas pero esta vez, nos fijamos en aquellos que tuvieran una identidad con un valor $E < 10^{-5}$ con los genes CAP59/CAP10. Se detectaron aquellas proteínas que tuvieran perfiles filogenéticos similares a las proteínas Cap59/10. Del mismo modo se buscaron los mutantes para aquellas proteínas en la colección de mutantes de *C. neoformans*.

Además, para investigar la posible función bioquímica y localización de las proteínas identificadas, la secuencia se analizó en las bases de datos PFAM/INTERPRO (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

10. Estadística

Las diferencias de tamaños de las células fueron analizadas mediante la prueba t de Student con el programa Graph Pad Prism 5 (La Jolla, California) y la correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular fue analizada mediante una correlación de Pearson con el programa Graph Pad Prism 5 (La Jolla, California). Las curvas de supervivencia se ajustaron

utilizando el método de Kaplan-Meier y las diferencias en supervivencia se analizaron con el test long-rank. En todos los casos un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Para estudiar la función de la morfogénesis de *Cryptococcus* durante la infección se han seguido distintas líneas que aparecen expuestas en esta memoria en diferentes secciones. Inicialmente se ha estudiado el primer cambio morfológico que experimenta dicho patógeno durante las primeras horas de interacción con el huésped, que es el incremento del tamaño de la cápsula. A continuación, se ha estudiado la formación de células gigantes en *Cryptococcus*. En esta parte del trabajo, se ha llevado a cabo una caracterización fenotípica de estas células en *C. neoformans* y *C. gattii*, y se ha estudiado su interacción con el huésped.

Sección I: Incremento de la cápsula en *Cryptococcus neoformans*

El incremento del tamaño de la cápsula de *C. neoformans* es un proceso que tiene lugar en las primeras horas durante la interacción con el huésped, y se ha descrito principalmente en roedores. Sin embargo, *Cryptococcus neoformans* es un patógeno ambiental capaz de infectar diferentes tipos de huéspedes, y por ello, quisimos estudiar la morfogénesis de *C. neoformans* durante la interacción con un huésped no mamífero como es el lepidóptero *Galleria mellonella*. Además, llevamos a cabo diferentes estrategias para identificar los mecanismos moleculares que regulan el crecimiento capsular.

1. Estudio del incremento capsular utilizando el modelo animal de *Galleria mellonella*

El crecimiento de la cápsula se ha descrito durante la interacción de *Cryptococcus* con huéspedes mamíferos. *Cryptococcus* puede además interaccionar con huéspedes ambientales, y dicha interacción es importante ya que se piensa que estos encuentros le han permitido adquirir los rasgos necesarios para causar infección en mamíferos. Por ello, decidimos estudiar si dichos cambios morfológicos ocurrían también durante la infección en el lepidóptero *G. mellonella*, modelo en el que ya se había estudiado la virulencia de *C. neoformans* (Mylonakis *et al.*, 2005). La utilización de este modelo tiene la ventaja adicional de minimizar los problemas bioéticos asociados a la experimentación animal con mamíferos, y permite el empleo de un gran número de individuos por experimento debido a su fácil manejo y su reducido coste.

1.1.- Interacción del huésped invertebrado *Galleria mellonella* con *Cryptococcus neoformans*

Para caracterizar la interacción entre *G. mellonella* y *C. neoformans*, en primer lugar intentamos reproducir el modelo de infección descrito en la literatura (Mylonakis *et al.*, 2005) e investigamos aspectos de la respuesta inmune de las larvas durante la infección por *C. neoformans*. Para ello, inoculamos larvas con distintas dosis de *C. neoformans* variedad *grubii* (cepa H99) y observamos que las larvas desarrollaban infección y morían. La tasa de mortalidad varió según la dosis, de

manera que cuando las larvas se inocularon con 10^2 células/larva (dosis baja), el 50% de mortalidad se produjo en el día 9. En cambio, en larvas inoculadas con 10^5 células/larva, el 50% de las larvas murieron en el día 5 (Figura 5A).

Galleria mellonella induce una respuesta inmune innata frente a la infección, constituida entre otros por un aumento de la densidad hemocitaria (Bergin *et al.*, 2003; Brennan *et al.*, 2002). Por ello, cuantificamos el número de hemocitos en la hemolinfa a distintos tiempos tras la inoculación de 10^4 células/larva de *C. neoformans*. Observamos que dichas larvas aumentaban hasta 7 veces el número de hemocitos presentes en la hemolinfa tras 2 h de la inoculación ($p<0,05$). Sin embargo, esta respuesta no se mantuvo en el tiempo, ya que pese a que la densidad hemocitaria fue siempre superior en las larvas inoculadas con *C. neoformans* que en aquellas inoculadas con PBS, las diferencias no fueron estadísticamente significativas a los 2 y 5 días de infección (Figura 5B). Además, evaluamos un mutante acapsular y su cepa parental (*cap59* y B3501, respectivamente) y no observamos diferencias estadísticamente significativas en la densidad hemocitaria entre las larvas infectadas con estas cepas, lo que indica que esta respuesta es independiente de la cápsula ($p>0,05$) (Figura 5C).

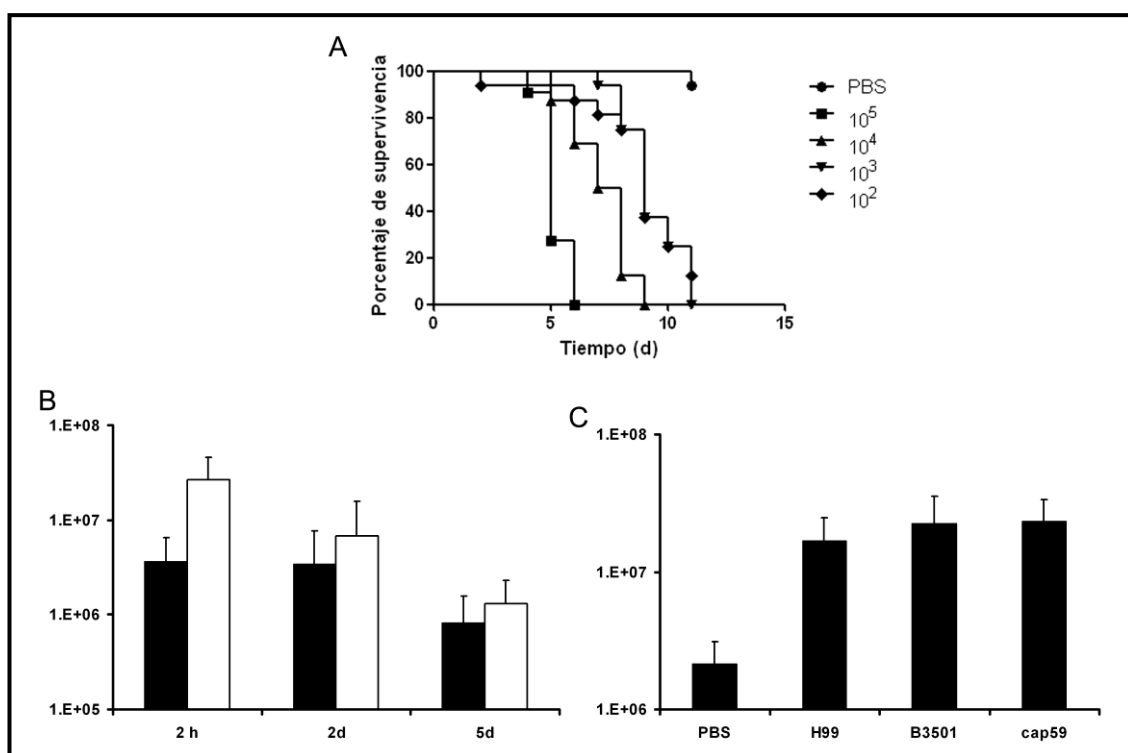


Figura 5. Virulencia de *C. neoformans* en *G. mellonella* y densidad hemocitaria de las larvas tras la infección con *C. neoformans*. (A) Supervivencia de las larvas de *G. mellonella* inoculadas con diferentes dosis de *C. neoformans* (cepa H99). (B) Densidad hemocitaria de las larvas tras 2h, 2d y 5d de infección con 10^4 células de *C. neoformans* (barras blancas) o con PBS (barras negras). Las barras representan la densidad hemocitaria media de 5 larvas. (C) Promedio de la densidad hemocitaria de 5 larvas infectadas con distintas cepas de *C. neoformans*. Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

También infectamos larvas de *G. mellonella* con células de *C. neoformans* muertas por calor y observamos que la densidad hemocitaria no sufría variaciones significativas respecto a la densidad hemocitaria cuantificada en las larvas inoculadas con PBS (resultados no mostrados).

1.2.- Morfogénesis de *Cryptococcus neoformans* durante la infección de *Galleria mellonella*

A continuación investigamos los cambios morfológicos de *C. neoformans* durante la infección de *G. mellonella*, y para ello medimos el tamaño total (incluida la cápsula), el tamaño del cuerpo celular (delimitado por la pared celular) y la cápsula de células recuperadas de larvas a distintos tiempos tras la infección. Los tamaños de las células crecidas en Sabouraud durante la noche previa al experimento y utilizadas para infectar a las larvas se tomaron como tiempo cero de la infección.

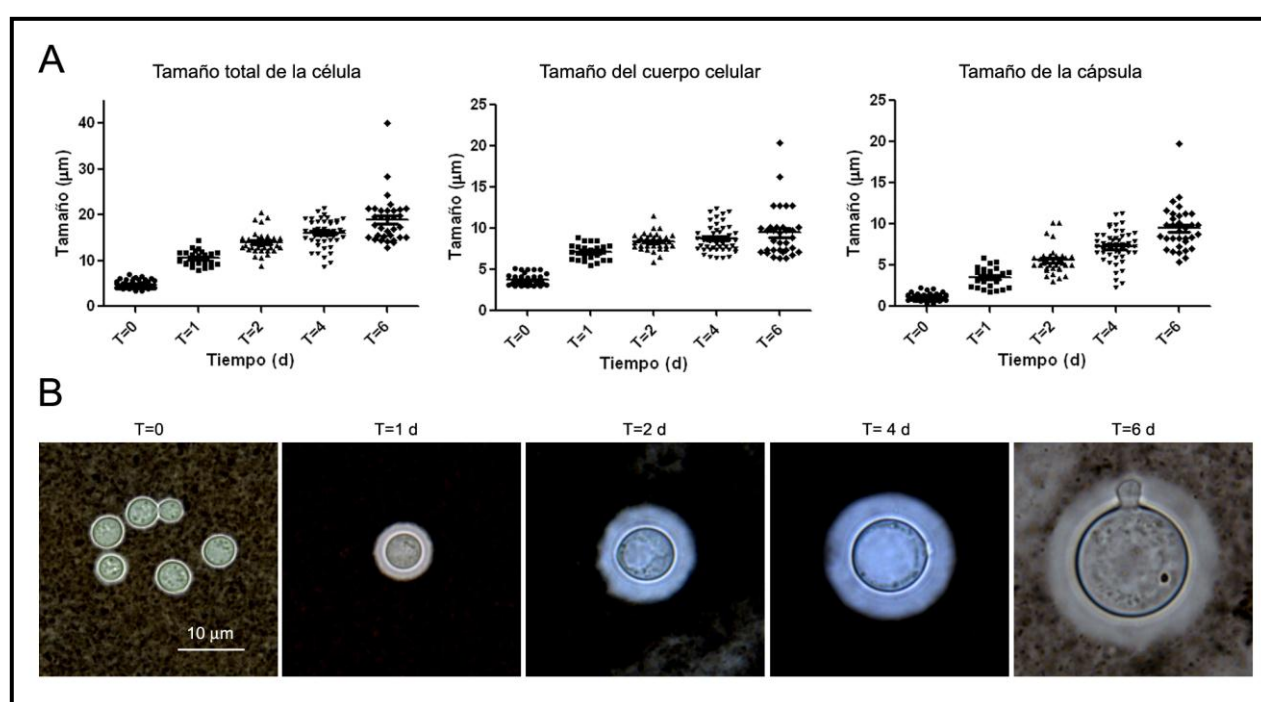


Figura 6. Cinética de tamaños de las células recuperadas de las larvas a diferentes días de la infección. (A) Distribución del tamaño total, cuerpo celular y cápsula de las células de *C. neoformans* crecidas en Sabouraud (T=0) y recuperadas de *G. mellonella* a distintos tiempos tras su inoculación con 10^5 células/larva. (B) Fotos representativas de suspensiones de tinta china de las células de *C. neoformans* recuperadas a los distintos tiempos de *G. mellonella*. La escala en el primer panel aplica al resto de paneles.

El tamaño medio de las células de *C. neoformans* recuperadas aumentó a todos los tiempos (Figura 6). Este incremento se debió tanto a un aumento del tamaño del cuerpo celular como a un aumento en el tamaño de la capsula al compararlos con los tamaños de las células crecidas *in vitro* ($p < 0,05$) (Figura 6).

1.3.- Efecto del crecimiento capsular en la fagocitosis

A continuación investigamos si el crecimiento capsular jugaba un papel en la virulencia de *C. neoformans* en *G. mellonella*. Por ello, estudiamos el efecto del incremento capsular sobre la fagocitosis. Para este propósito indujimos *in vitro* el crecimiento capsular de *C. neoformans* mediante su incubación en 10% Sabouraud a pH neutro (ver Material y métodos). Cuando se infectaron las larvas con células de *C. neoformans* incubadas en Sabouraud líquido observamos que aproximadamente un 20% de los hemocitos contenían *C. neoformans* tras 2 horas de incubación (Figura 7). Por el contrario, las células con la cápsula inducida no fueron fagocitadas (Figura 7).

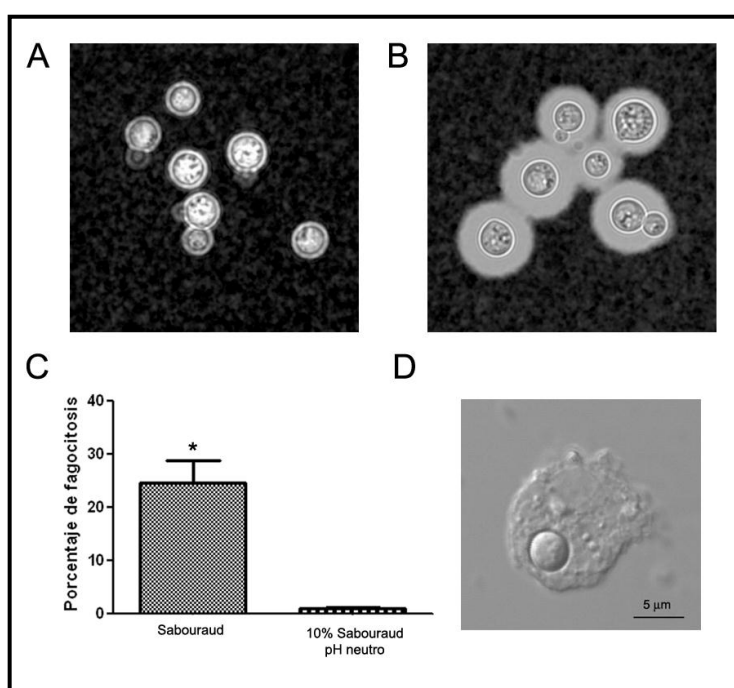


Figura 7. Fagocitosis de *C. neoformans* por hemocitos de *G. mellonella*. Células de *C. neoformans* (H99) crecidas en (A) condiciones regulares (B) medio de inducción de la cápsula (10% Sabouraud tamponado en MOPS a pH neutro). (C) Porcentaje de hemocitos con células de *C. neoformans* en su interior con cápsula pequeña (Sabouraud) y con cápsula grande (inducida en 10% Sabouraud tamponado en MOPS a pH neutro). El asterisco indica un valor $p < 0,05$. (D) Imagen de un hemocito con una célula de *C. neoformans* en su interior.

Para confirmar que la cápsula tiene un efecto inhibitorio de la fagocitosis llevada a cabo por los hemocitos, infectamos larvas con dos cepas de *C. neoformans* (H99 y B3501) y con el mutante acapsular *cap59* (cepa C536). Como se observa en la figura 8, el porcentaje de fagocitosis aumentó hasta el 30% cuando se empleó la cepa deficiente en cápsula ($p < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias cuando se emplearon las cepas de *C. neoformans* variedad *grubii* H99 o *C. neoformans* variedad *neoformans* B3501 (Figura 8).

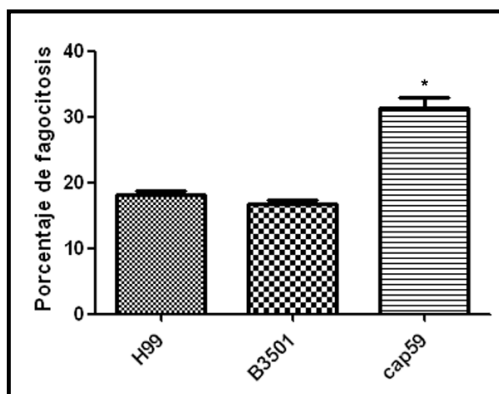


Figura 8. Fagocitosis *in vivo* de distintas cepas de *C. neoformans* con cápsula (H99 y B3501) y el mutante acapsular *cap59*. El asterisco indica un valor $p < 0,05$.

Sin embargo, cuando comparamos la supervivencia de larvas infectadas con células con cápsula pequeña y células con cápsula grande no observamos ninguna diferencia (Figura 9), indicando que la fagocitosis inicial no predice el curso de la infección.

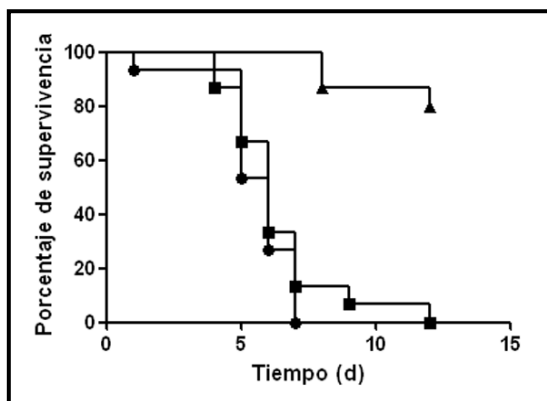


Figura 9. Curvas de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con 10^5 células de *C. neoformans* con cápsula pequeña (●) y con cápsula grande (■). Un grupo de larvas fue inoculado con PBS en paralelo como control (▲).

1.4.- Influencia de la temperatura en la morfogénesis de *C. neoformans* en *G. mellonella*

En anteriores estudios se demostró que *C. neoformans* es menos virulento en *G. mellonella* cuando las larvas se mantienen a 30°C tras la infección comparado con la incubación a 37°C (Mylonakis 2005). Por ello investigamos si esta diferencia en virulencia se correlacionaba con diferencias en la morfogénesis durante la infección. En primer lugar reproducimos la virulencia de *C. neoformans* en *G. mellonella* a ambas temperaturas, confirmando que la virulencia de la levadura era mayor a 37°C (Figura 10 A).

A continuación quisimos saber si la diferencia de virulencia se correlacionaba con el crecimiento de la levadura a ambas temperaturas. Por ello, realizamos curvas de crecimiento en Sabouraud líquido a 30 y 37°C (Figura 10 B). Como se observa en la figura 10 B, *C. neoformans* creció mejor a 30°C que a 37°C.

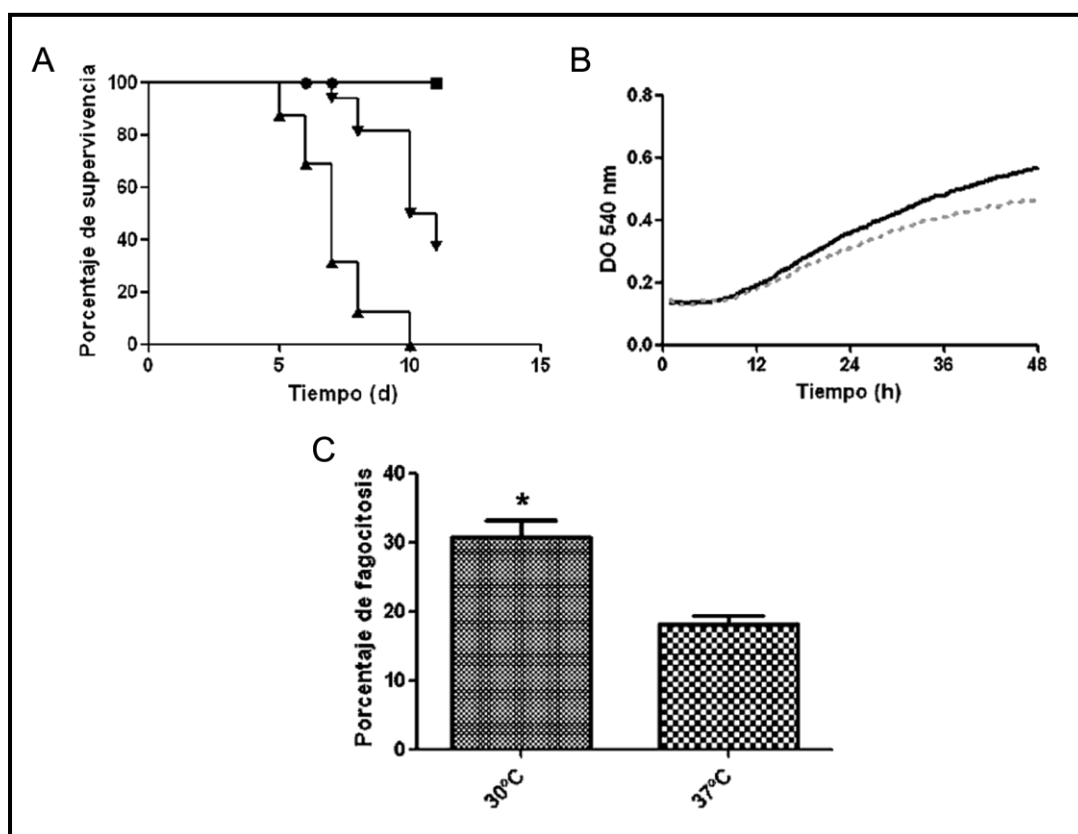


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la virulencia y crecimiento capsular de *C. neoformans* durante la infección en *G. mellonella*. (A) Curvas de supervivencia de *G. mellonella* inoculadas con 10^4 células de *C. neoformans* H99 incubadas a 30°C (▼) y 37°C (▲). Un grupo inoculado con PBS fue incubado a 30°C (●) y otro a 37°C (■) como control (B) Curvas de crecimiento de *C. neoformans* H99 a 30°C (línea negra) y 37°C (línea gris de puntos) durante 48h (C) Fagocitosis *in vivo* de *C. neoformans* H99 a 30 y 37°C. El asterisco indica un valor $p < 0,05$.

En paralelo, estudiamos si la fagocitosis de *C. neoformans* estaba afectada por la temperatura de incubación de las larvas tras la infección. Para ello, inoculamos 2 grupos de larvas con 10^6 células de *C. neoformans* previamente teñidas con Calcofluor (ver Material y métodos) y las incubamos a las dos temperaturas. Tras 2 horas de incubación, se extrajo la hemolinfa de 3 larvas de cada grupo para cuantificar la fagocitosis. Observamos que la fagocitosis ocurría de forma más eficiente a 30°C que a 37°C ($p=0,0011$), lo que sugiere que la inmunidad de las larvas está afectada a 37°C.

A continuación quisimos comprobar si la virulencia a diferentes temperaturas se correlacionaba con la magnitud de los cambios morfológicos. Para ello, infectamos dos grupos larvas con *C. neoformans*, y se incubaron a 30 y 37°C. Al cabo de 3 días de infección, aislamos las levaduras y observamos su morfología al microscopio. *Cryptococcus neoformans* experimentó un aumento tanto en el tamaño del cuerpo celular como en el de la cápsula a ambas temperaturas (Figura 11). Sin embargo, este incremento fue estadísticamente mayor en las células recuperadas de larvas incubadas a 37°C que en aquellas incubadas a 30°C ($p<0,05$) (Figura 11).

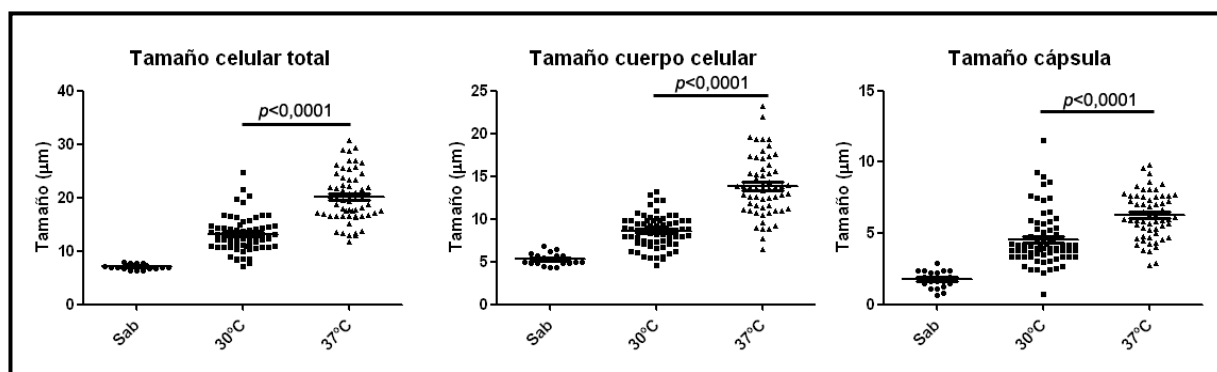


Figura 11. Distribución del tamaño total, tamaño del cuerpo celular y cápsula de células de *C. neoformans* crecidas en Sabouraud (Sab) y recuperadas de *G. mellonella* a distintas temperaturas (30 y 37°C) tras 3 días de infección. La línea horizontal en cada grupo señala la media del tamaño en esa condición.

1.5.- Cambios en la estructura de la cápsula durante la infección en *G. mellonella*.

Además de cambiar de tamaño, la cápsula sufre cambios en su estructura durante la infección (Garcia-Hermoso *et al.*, 2004). Por ello, investigamos si durante la infección de *G. mellonella* se producía también cambios estructurales de la cápsula. Para ello, teñimos la cápsula de células crecidas *in vitro* y de células recuperadas de las larvas con el anticuerpo monoclonal IgG1 18B7 conjugado al fluoróforo Alexa-488 y comparamos los patrones de fluorescencia (Figura 12). En estos experimentos, la pared celular fue teñida con Uvitex (fluorescencia azul, ver materiales y métodos). En todos los casos, encontramos un patrón de fluorescencia anular y homogéneo alrededor del cuerpo celular (Figura 12).

Sin embargo, observamos diferencias en el lugar de unión del anticuerpo. En las células recuperadas de *G. mellonella*, el anticuerpo monoclonal se unió principalmente a la región más externa de la cápsula, encontrando poca o ninguna señal de fluorescencia en la región más próxima a la pared celular (Figura 12).

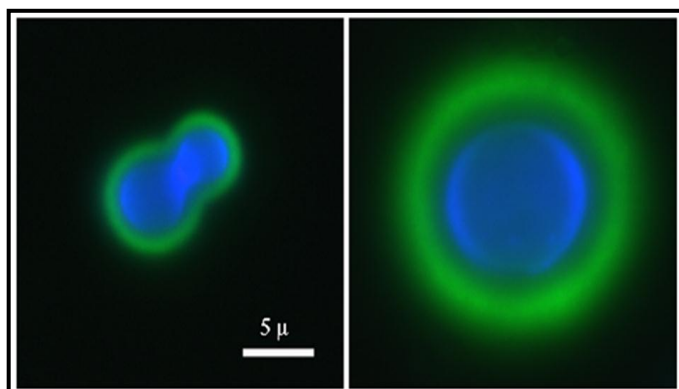


Figura 12. Inmunofluorescencia de la cápsula de células de *C. neoformans* crecidas *in vitro* (izquierda) y recuperadas de *G. mellonella* (derecha). La pared celular aparece marcada en azul por el Uvitex, mientras que la cápsula aparece en verde debido a la unión del anticuerpo monoclonal IgG1 18B7 conjugado al fluoróforo Alexa-488. La barra de escala aplica a los 2 paneles.

Estos resultados sugieren que la infección en *G. mellonella* está asociada un incremento en la densidad de la cápsula que reduce la permeabilidad e impide la penetración de determinadas moléculas hacia regiones cercanas a la pared celular. Para confirmar esta posibilidad, investigamos la internalización de un dextrano fluorescente de 70 KDa en la cápsula. Para ello, realizamos fotos de las suspensiones de tinta china (con el fin de visualizar los límites de la pared celular y de la cápsula) en campo claro y con el filtro rojo (600 nm) para ver la rodamina (con el fin de observar la penetración del dextrano, fluorescencia roja).

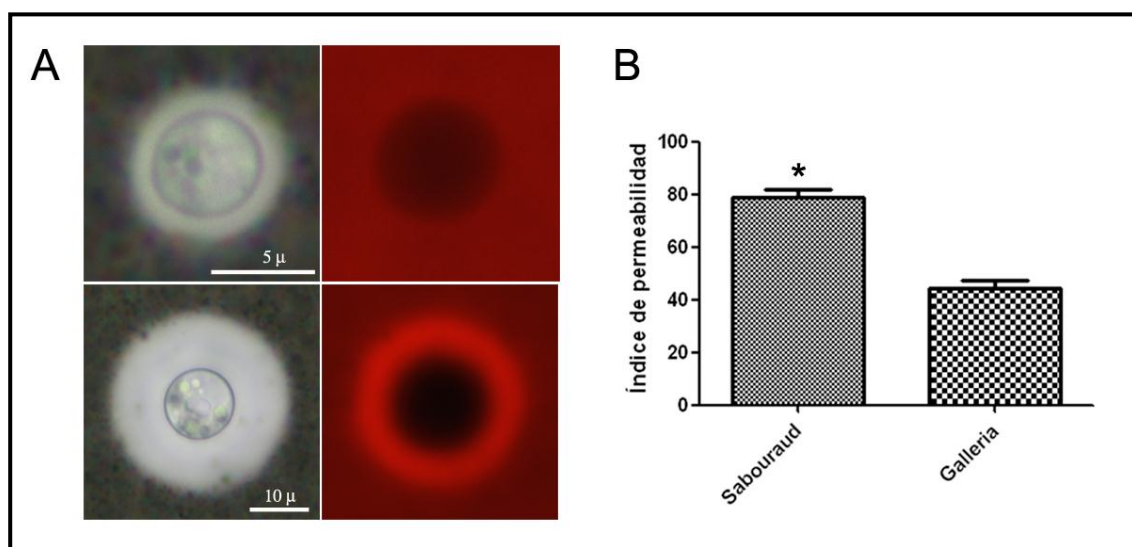


Figura 13. Permeabilidad de la cápsula. Penetración del dextrano fluorescente de 70 kDa en la cápsula. **(A)** El panel superior se muestra una célula de *C. neoformans* de las crecidas en Sabouraud, mientras que el panel inferior se muestra una célula de las recuperadas de *G. mellonella* **(B)** Índice de permeabilidad calculado para las células crecidas *in vitro* (Sabouraud) y para las células recuperadas de *G. mellonella* (Galleria). El asterisco indica un valor $p < 0,001$.

En las células crecidas *in vitro*, el dextrano penetró en la cápsula hasta las regiones más internas, cercanas a la pared celular, llegándose a cuantificar una penetración de aproximadamente el 75% del diámetro de la cápsula (Figura 13). Sin embargo, en las células recuperadas de *G. mellonella*, el dextrano no pudo penetrar hasta las regiones más internas de la cápsula, cuantificándose una penetración de tan solo el 45% del diámetro de la cápsula (Figura 13). Estos resultados confirman una reducción en la permeabilidad de la cápsula consistente con el aumento de la densidad de la misma observada tras el paso por el huésped.

1.6.- Identificación de elementos de *G. mellonella* que inducen el crecimiento capsular

Además de los experimentos *in vivo*, llevamos a cabo experimentos *in vitro* para identificar qué moléculas de *G. mellonella* son las responsables de inducir el crecimiento capsular. Además de un extracto de larvas completo, investigamos también la fracción lipídica polar de dicho extracto, ya

que fracciones similares de *Acanthamoeba castellanii* y macrófagos murinos inducen el crecimiento capsular de *C. neoformans* (Chrisman *et al.*, 2011). En paralelo se utilizó Sabouraud líquido, PBS y 10% Sabouraud (pH 7,3). En primer lugar se analizó el crecimiento de *C. neoformans* en las diferentes fracciones y/o medios (Figura 14).

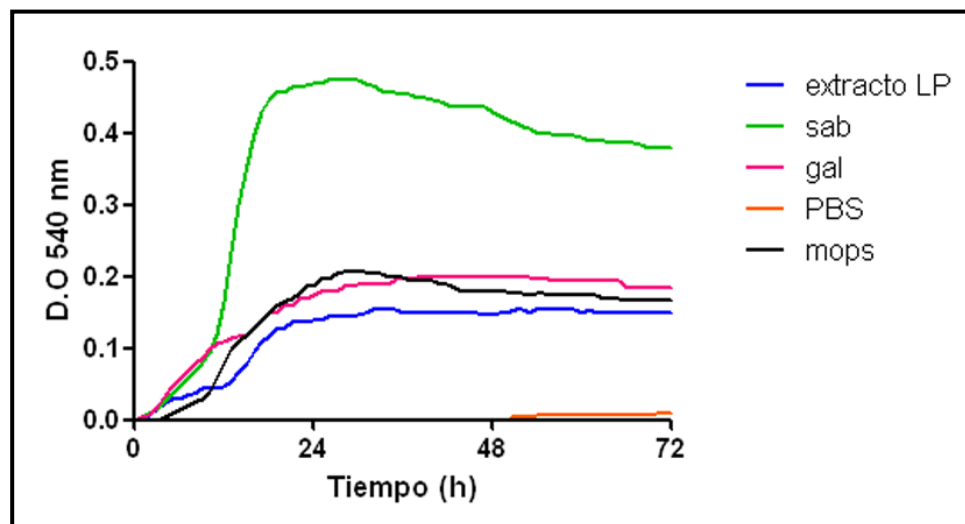


Figura 14. Curvas de crecimiento de *C. neoformans* H99 en diferentes extractos preparados a partir de larvas de *G. mellonella*. Extracto lipídico polar del extracto completo de larvas de *G. mellonella* (extracto LP), Sabouraud (sab), extracto completo de *G. mellonella* (gal), PBS (PBS) y medio inductor de cápsula (mops) a 37°C.

Cryptococcus neoformans creció de manera similar en los medios analizados, excepto en PBS, donde no hubo crecimiento. Cuando analizamos el tamaño de las células tras 10 días de incubación en los medios descritos, observamos que la incubación de *C. neoformans* en extracto completo de *G. mellonella*, así como en la fracción polar lipídica, resultó en un aumento del tamaño total de las células, el cual se debió tanto a un aumento en el tamaño del cuerpo celular como a un aumento en el tamaño de la cápsula (Figura 15). Las células incubadas en PBS mostraron una disminución de su tamaño. Curiosamente, el aumento del tamaño de la cápsula observado en las células incubadas en la fracción polar lipídica fue similar al observado en las células incubadas en el medio inductor de cápsula (Sabouraud diluido y tamponado a pH neutro) (Figura 15).

La observación de los mismos cambios en tamaño y estructura de la cápsula de *C. neoformans* durante la infección en ratón y en las larvas de *G. mellonella* nos ha permitido validar la utilización de este modelo no vertebrado para el estudio de la morfogénesis de *C. neoformans* así como factores del huésped responsables de la inducción de cápsula.

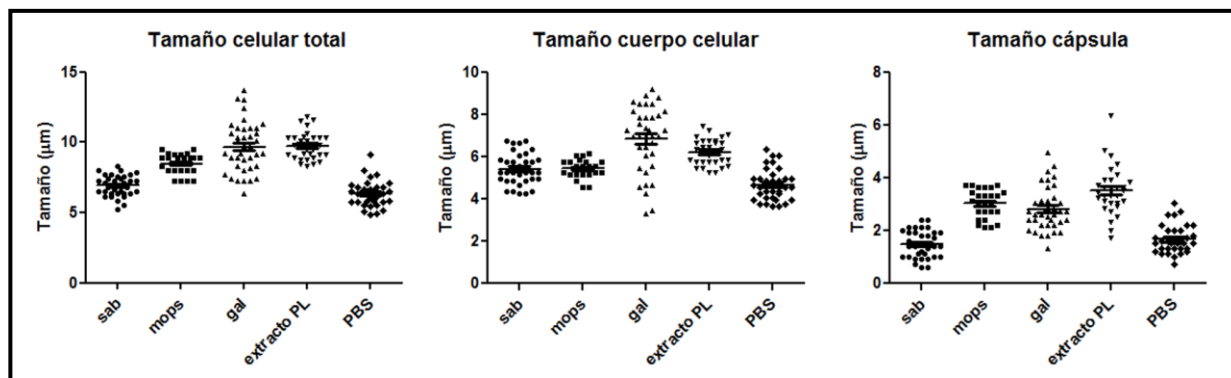


Figura 15. Distribución del tamaño total, cuerpo celular y cápsula de las células de *C. neoformans* H99 crecidas en los distintos extractos y/o medios a 37°C durante 10 días. Sabouraud líquido (sab), medio inductor de cápsula (10% Sabouraud en MOPS a pH 7,3) (mops), extracto completo obtenido a partir de un homogeneizado de larvas de *G. mellonella* (gal), fase polar lipídica del extracto completo de *G. mellonella* (extracto PL) y tampón PBS (PBS).

2.- Identificación de elementos involucrados en el crecimiento capsular

La cápsula es el principal factor de virulencia de *C. neoformans* y pese a que en los años 90 se describieron los primeros genes necesarios para su síntesis, todavía se desconocen los mecanismos involucrados en el crecimiento capsular. Por ello, diseñamos una estrategia para la identificación de elementos involucrados en la síntesis y en el crecimiento de la cápsula. Además planteamos una hipótesis sobre la regulación del crecimiento de la cápsula y su posible relación con el ciclo celular en *C. neoformans*.

2.1.- Abordaje genómico para identificar genes involucrados en la síntesis y/o crecimiento de la cápsula

Para llevar a cabo la identificación de posibles nuevos genes involucrados en la morfogénesis de la cápsula de *C. neoformans* se colaboró con el grupo del Dr. Gabaldón del CRG de Barcelona. Mediante la utilización de herramientas bioinformáticas y un abordaje genómico, se realizó una comparación de 60 genomas de hongos (Anexo 1) con el fin de identificar en *C. neoformans* genes que cumplieran las siguientes premisas: (1) *Cryptococcus* es el único género de levaduras que presenta una cápsula, de modo que pensamos que deben existir genes involucrados en la síntesis de la cápsula que sólo se encuentren en esta levadura y no en otros géneros. (2) Genes con la misma función suelen tener una evolución similar (Chen y Jeong, 2000; Gabaldon, 2008), por lo que buscamos genes que hubieran evolucionado de manera similar a los genes *CAP*, en concreto a *CAP59/CAP10*, que son genes ya descritos como imprescindibles en la síntesis de la cápsula de

C. neoformans (Chang y Kwon-Chung, 1994; Chang y Kwon-Chung, 1998; Chang y Kwon-Chung, 1999; Chang *et al.*, 1996).

Con ello obtuvimos un total de 1502 proteínas con posible origen único en *C. neoformans*. De ellos, nos centramos en aquellas proteínas secretadas o con señales de secreción, ya que la cápsula es una estructura extracelular, y pensamos que en el ensamblaje y síntesis de la cápsula deben participar proteínas de localización extracelular. Para ello, la secuencia proteica fue analizada con SignalP, y se identificaron 122 proteínas secretadas o con péptido señal de secreción (Figura 16).

Por otro lado, obtuvimos un total de 46 genes con perfil evolutivo común a los genes *CAP59/CAP10*, y nuevamente 10 de ellas fueron identificadas como proteínas secretadas o con péptido señal de secreción (Figura 16).

En la ATCC existe una colección de aproximadamente 1200 mutantes de *C. neoformans* obtenidos mediante mutagénesis dirigida por transformación biolística (Liu *et al.*, 2008), la cual está disponible en nuestro laboratorio. De forma que de esas 1502 posibles proteínas con origen único en *C. neoformans*, existen 23 mutantes disponibles en la mencionada colección, aunque tan sólo 2 de ellas cumplían el requisito de ser proteínas secretadas o con señal de secreción (Figura 16). Por otro lado también encontramos en la colección 10 mutantes de las 46 proteínas identificadas con origen filogenético común a genes *CAP59/CAP10*, teniendo 2 de ellas péptido señal de secreción (Tabla 4). Curiosamente, 6 de las 10 proteínas ya habían sido descritas o al menos anotadas en Genbank como proteínas relacionadas con la cápsula de *C. neoformans*, lo que validaba la estrategia seguida para la identificación de nuevos genes implicados en este proceso (Figura 16, Tabla 4).

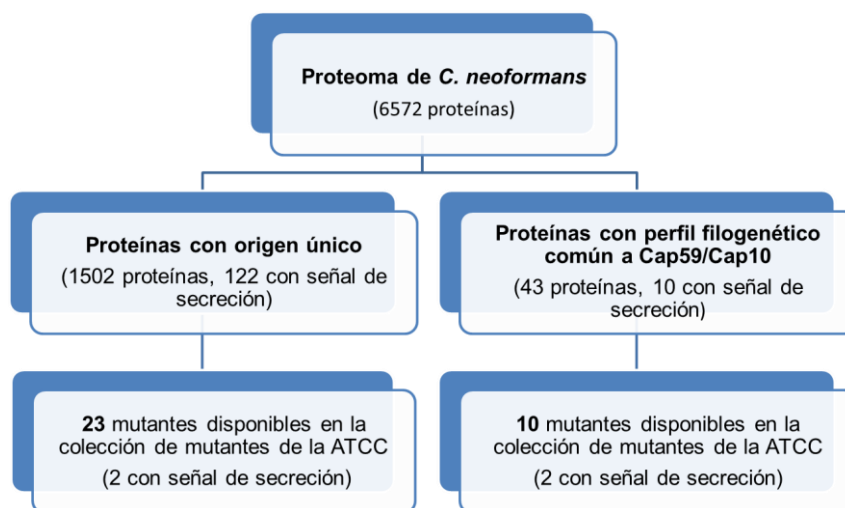


Figura 16. Esquema del abordaje seguido para la identificación de genes involucrados en la síntesis de la cápsula.

Con el total de los 33 mutantes disponibles en la colección realizamos un análisis preliminar para detectar defectos en los principales factores de virulencia de *C. neoformans*.

2.2.- Caracterización in vitro de los mutantes seleccionados

En primer lugar, analizamos la capacidad de los mutantes disponibles en la colección para crecer a 37°C. Para ello, todos los mutantes se colocaron en paralelo en dos placas de Sabouraud para incubarlas posteriormente a 30 y 37°C, llevando como control la cepa silvestre parental H99. Comprobamos que todos los mutantes eran capaces de crecer a ambas temperaturas de manera similar a como lo hacía la cepa silvestre (resultados no mostrados).

En la siguiente tabla se muestran todos los mutantes analizados en este trabajo

Origen único en C.n	Nombre asignado	Origen filogenético comun a genes CAP	Nombre asignadoo
CNAG_04661		CNAG_01283	CAP5
CNAG_04681		CNAG_00600	CAP60
CNAG_00887		CNAG_00151	Pept. unión a prot
CNAG_05422	LIV11	CNAG_01834	
CNAG_03195		CNAG_00677	
CNAG_06574	APP1	CNAG_00746	CAS35
CNAG_01506		CNAG_02885	CAP64
CNAG_00506		CNAG_01654	CAS34
CNAG_04262		CNAG_02797	CPL1
CNAG_04473		CNAG_02581	
CNAG_01910			
CNAG_04788			
CNAG_06157			
CNAG_05786			
CNAG_05528			
CNAG_00998			
CNAG_00701			
CNAG_05279			
CNAG_01996			
CNAG_02103			
CNAG_02877			
CNAG_01644	MLN4		
CNAG_00091			

Tabla 4. Lista de mutantes seleccionado y disponibles en la colección de mutantes de la ATCC de *C. neoformans*

A continuación, investigamos si alguno de estos mutantes tenía defectos de inducción de la cápsula tras transferir las células a medio inductor (ver Material y métodos). El coeficiente de inducción muestra la relación entre el tamaño de la cápsula en condiciones de inducción y el tamaño de la cápsula en condiciones regulares.

De esta forma, un coeficiente de inducción igual a 1 implica que el tamaño de la cápsula en el medio inductor es igual al tamaño de la cápsula basal, lo que significa que no se produjo inducción de la cápsula. En contra, los valores superiores a 1 muestran una inducción de la cápsula en las condiones citadas.

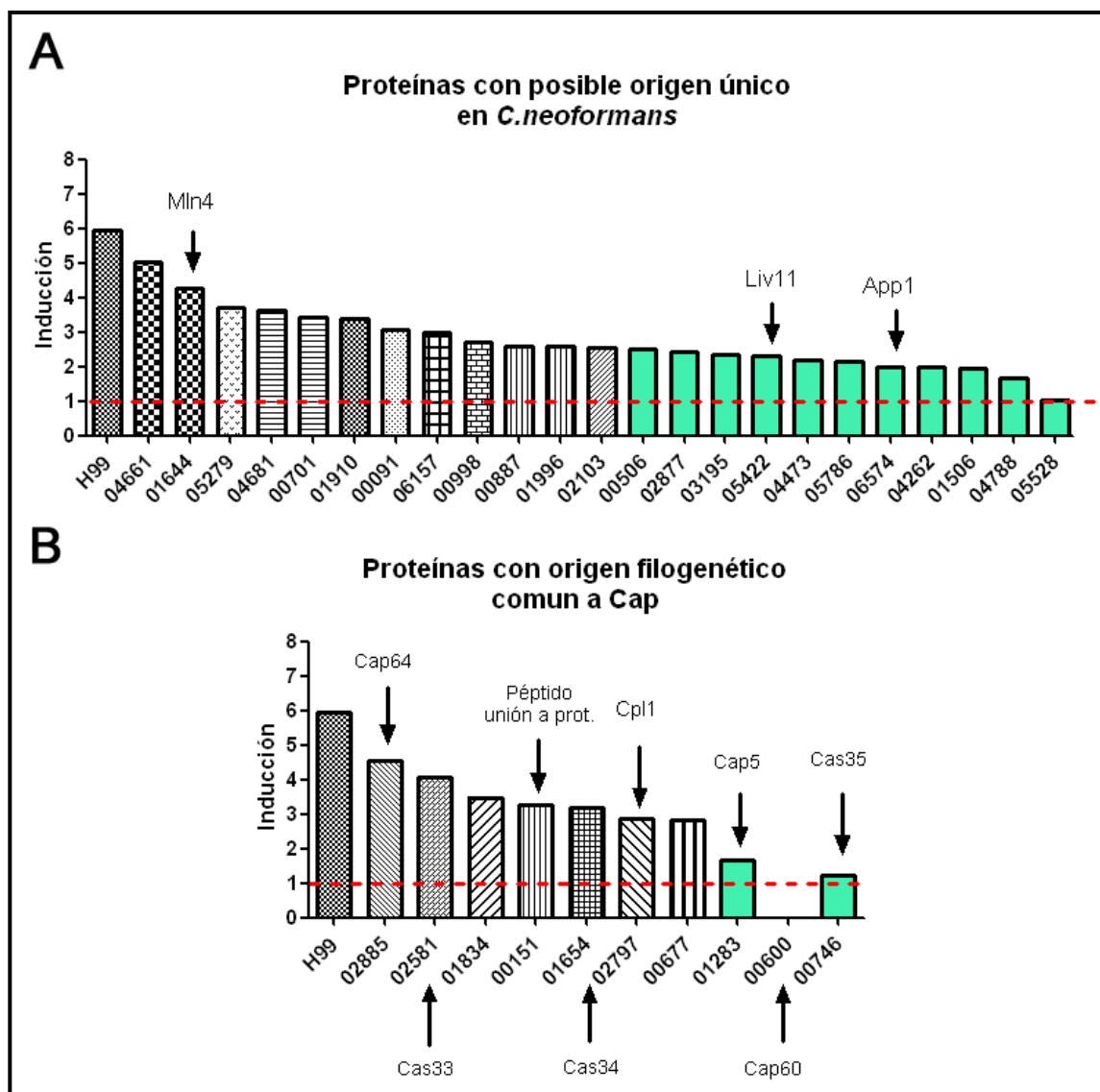


Figura 17. Coeficiente de inducción de la cápsula en las cepas mutantes seleccionadas de *C. neoformans*. Proteínas con posible origen único en *C. neoformans* (A). Proteínas con origen filogenético común a Cap (B). Las barras en color verde indican aquellos coeficientes con un valor inferior a 2,5. Las flechas negras señalan aquellas proteínas previamente identificadas. La línea roja de puntos señala un coeficiente de inducción de 1.

La cepa silvestre H99 experimentó un aumento del tamaño de la cápsula de casi de 6 veces, con lo que arbitrariamente definimos que aquellos mutantes cuyo coeficiente de inducción de la cápsula no superara las 2,5 veces presentaban un defecto significativo para llevar a cabo este proceso. Respecto a los mutantes de proteínas con posible origen único en *C. neoformans*, 11 de ellos presentaron un coeficiente de inducción inferior a 2,5 (Figura 17 A, señalados en verde). Sin embargo, los dos mutantes de proteínas con péptido señal de secreción (CNAG_04661 y CNAG_00701) no presentaron defectos en la inducción de la cápsula en nuestras condiciones. A pesar de ello, encontramos algunos mutantes de proteínas con coeficientes alrededor de uno que no han sido hasta ahora identificadas, y que serán el objeto de futuros estudios (CNAG_00506, CNAG_02877, CNAG_03195, CNAG_04473, CNAG_05786, CNAG_04262, CNAG_01506, CNAG_04788, CNAG_05528). Respecto a los mutantes de las proteínas con origen filogenético común a Cap59/Cap10, sólo 3 de los 10 mostraron un coeficiente de inducción inferior a 2,5 (Figura 17 B, señalados en verde), incluyendo una cepa acapsular (CNAG_00600, Cap60). Además, con los mutantes CNAG_01654 y CNAG_02797 (aquellos con péptido señal de secreción) se obtuvieron coeficientes de inducción alrededor de 3, muy cercanos al umbral seleccionado (Figura 17 B).

Finalmente para terminar la caracterización *in vitro* se analizó la capacidad de dichos mutantes para producir melanina en presencia de substrato adecuado (ver Material y métodos). Tras 72 h, todos los mutantes fueron capaces de producir melanina al igual que la cepa silvestre H99, con lo que sus mutaciones no parecen afectar a este factor de virulencia (resultados no mostrados).

2.3.- Caracterización *in vivo* de los mutantes seleccionados

Para analizar la virulencia de los mutantes seleccionados utilizamos el modelo de huésped no invertebrado *Galleria mellonella*. Este modelo es idóneo para un primer análisis de la virulencia de un gran número de cepas ya que permite realizar de manera fácil infecciones en paralelo con un gran número de mutantes. Además, para el rastreo de colecciones de mutantes, *G. mellonella* supone también un modelo óptimo, ya que este abordaje en ratones no está justificado éticamente debido al alto número de ratones que habría que infectar con cepas de las que se tiene poca evidencia sobre su virulencia.

Respecto a los mutantes de posibles proteínas con origen único en *C. neoformans*, 8 de los 23 resultaron ser menos virulentos con un valor $p < 0,05$ (Figura 18 A, en rojo). De entre ellos, los mutantes carentes de CNAG_00506, CNAG_01506, CNAG_04788 y CNAG_05422 presentaron además defectos en la inducción de la cápsula. Es importante destacar que el mutante carente de CNAG_05422 ya había sido nombrado como *LIV11* (*Lung Infectivity*) al observarse una disminución estadísticamente significativa en la capacidad de producir infección en un modelo de infección

intranasal en ratón (Liu *et al.*, 2008). Además, también encontramos 4 mutantes de proteínas con posible origen único en *C. neoformans* que no presentaban defectos significativos de inducción capsular *in vitro*, pero que sin embargo, tuvieron una virulencia reducida con respecto a la cepa silvestre H99 (mutantes carentes de CNAG_04681, CNAG_04661, CNAG_00701 y CNAG_00998). Por último, el mutante carente de CNAG_01644 ya había sido descrito como *MLN4*, una proteína específica de *Cryptococcus* con función desconocida y sin defectos en la síntesis e inducción de la cápsula, pero sí una menor virulencia asociada (Liu *et al.*, 2008). En nuestro modelo, pudimos observar un retraso en la virulencia pero sin llegar a ser estadísticamente significativo. Por otro lado, el mutante CNAG_06574 también había sido descrito como *APP1* (Luberto *et al.*, 2003), un gen que codifica para una proteína antifagocítica, única de *Cryptococcus* que presentó una inducción de la cápsula inferior a la cepa silvestre, ya que no superó el umbral de 2,5 y una virulencia similar a la cepa silvestre en nuestro modelo.

En el caso de los mutantes de proteínas con evolución filogenética común a Cap59/Cap10, los mutantes carentes de CNAG_00600, es decir, $\Delta cap60$ y el mutante de CNAG_00746, es decir $\Delta cas35$, resultaron ser avirulentos y presentar defectos en la cápsula, tal y como ya se había descrito (Chang y Kwon-Chung, 1998; Moyrand *et al.*, 2004) (Figura 18). Sin embargo, al igual que sucede con los mutantes de proteínas de origen único en *C. neoformans*, también encontramos mutantes con origen filogenético común a Cap 59/Cap10 que presentaron una menor virulencia en nuestro modelo (mutantes carentes de CNAG_00151 y CNAG_02797) y también habían sido descritos (Liu *et al.*, 2008). Sin embargo, estos mutantes no presentaron defectos en la inducción de la cápsula (Figura 17 B).

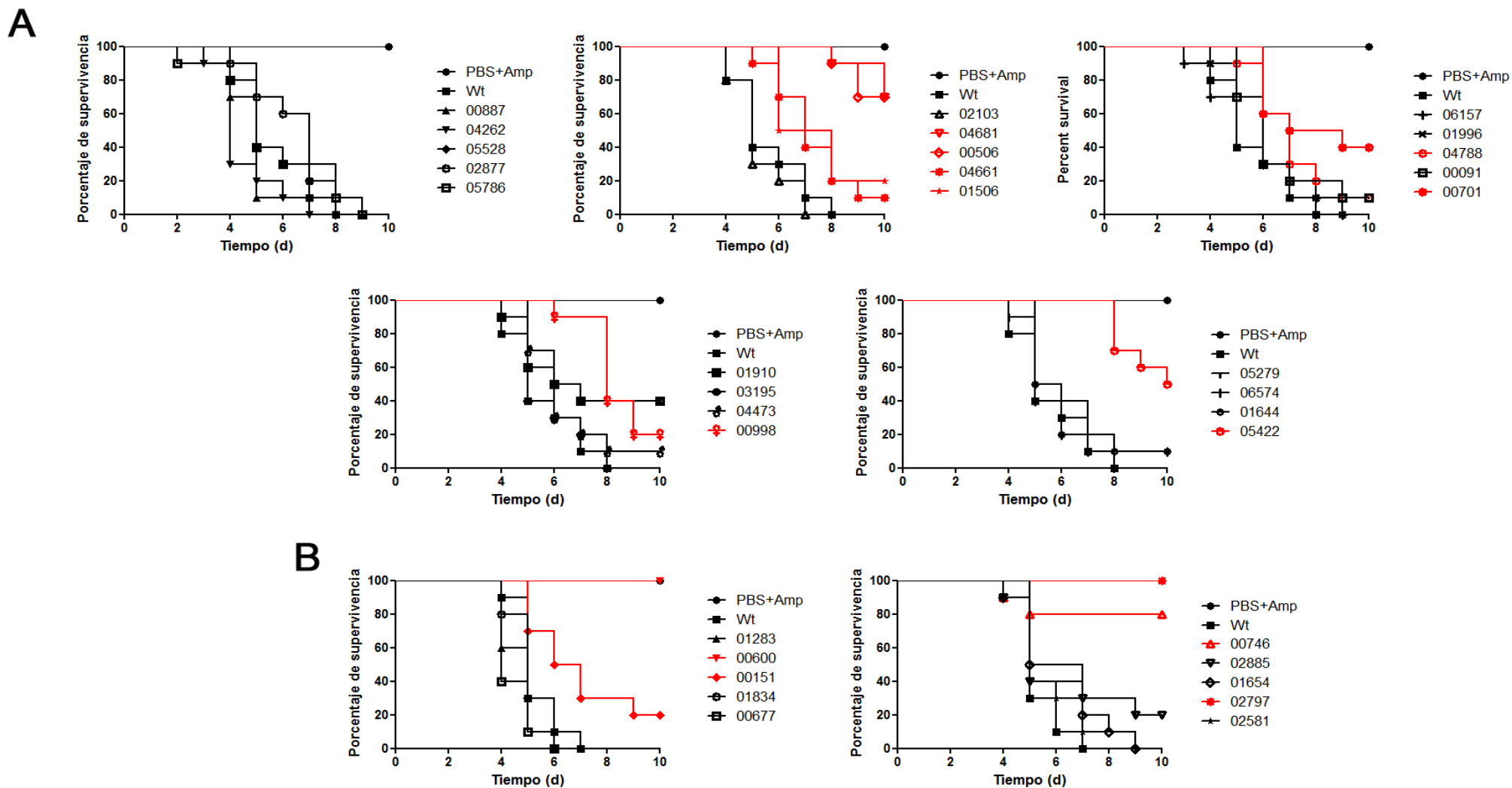


Figura 18. Supervivencia de los mutantes analizados. Supervivencia de los mutantes de proteínas con posible origen único en *C. neoformans* **(A)**. Supervivencia de los mutantes de proteínas con origen filogenético común a genes *CAP* **(B)**. En ambos casos las cepas estadísticamente menos virulentas que la cepa silvestre (H99) aparecen en rojo ($p < 0.05$).

3.- Relación entre el crecimiento capsular y el ciclo celular en *Cryptococcus neoformans*

Los mecanismos y elementos que regulan el crecimiento capsular no son conocidos. Sin embargo, diferentes evidencias nos hicieron plantearnos que este proceso está relacionado con el ciclo celular. A continuación exponemos los resultados previos que nos hicieron plantear esta hipótesis:

- Se ha comprobado que tras la inducción del crecimiento capsular, existe una correlación entre el tamaño de la célula y el de la cápsula (Zaragoza *et al.*, 2003a). Ya que el tamaño celular depende del estado del ciclo celular, este hecho nos hizo plantearnos que el crecimiento de la cápsula estaba coordinado con el aumento del cuerpo celular, el cual ocurre principalmente en la fase G1 (Zaragoza y Casadevall, 2004).

- Se han descrito varios medios en los que *Cryptococcus* induce la cápsula, y en todos ellos, el crecimiento de la levadura es más lento, lo que sugiere que la inducción de la cápsula está favorecida por condiciones que alargan el ciclo celular.

- Por último, pensamos que el crecimiento capsular ocurre también en la fase G1, ya que la acumulación de polisacárido durante las fases S-G2-M puede dificultar la separación de la gema de la célula madre.

Por ello, decidimos investigar si elementos que regulan la progresión del ciclo celular jugaban un papel crucial durante el crecimiento de la cápsula.

3.1.- Análisis del contenido en ADN de *C. neoformans* durante el crecimiento capsular

En primer lugar investigamos si el ciclo celular sufría algún cambio durante el crecimiento capsular. Para ello, indujimos el crecimiento de la cápsula en Sabouraud al 10% (pH 7,3) y medimos el contenido de ADN a diferentes tiempos mediante citometría de flujo tras teñir las células con yoduro de propidio (ver Material y métodos). Como se muestra en la Figura 19A, las células crecidas en Sabouraud líquido durante la noche previa al experimento se encontraban principalmente en la fase G2. Sin embargo, cuando las células fueron transferidas al medio inductor de cápsula, observamos una acumulación de células en fase G1 (1n) (Figura 19 A).

En paralelo, se midieron los tamaños de las cápsulas de las células a los distintos tiempos para confirmar el aumento del tamaño de la cápsula en el medio inductor. El aumento del tamaño de la cápsula fue visible tras las primeras 3 horas de incubación y dicho aumento siguió progresando hasta las 6 horas ($p < 0,05$) (Figura 19 B). Por lo tanto, este resultado sugiere que durante el crecimiento capsular se produce una parada del ciclo celular en la fase G1.

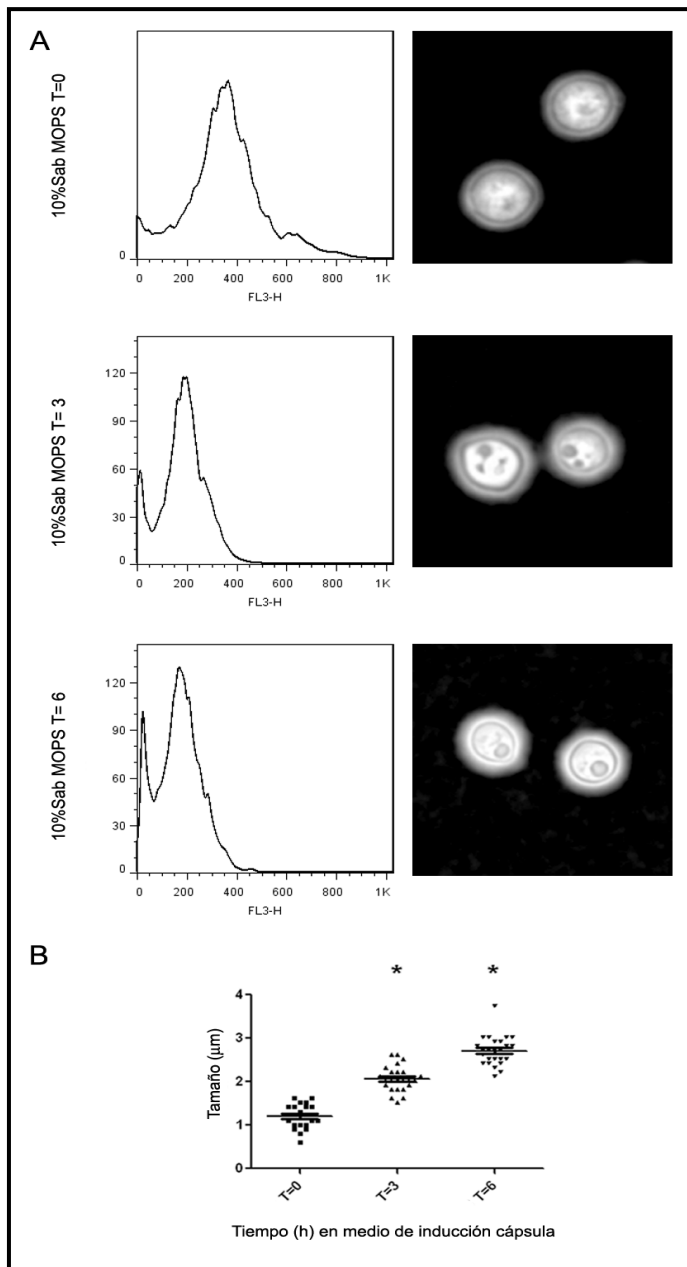


Figura 19. Ciclo celular e incremento del tamaño de la cápsula. (A) Análisis de la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo en condiciones de inducción del tamaño de la cápsula (10% Sabouraud en MOPS, pH7,3) **(B)** Distribución del tamaño de la cápsula a los distintos tiempos estudiados. El asterisco indica un valor $p < 0,05$.

3.2.- Estudio del crecimiento capsular en presencia de inhibidores del ciclo celular

A continuación investigamos el efecto de inhibidores del ciclo celular sobre el crecimiento capsular de *C. neoformans*. En primer lugar utilizamos rapamicina, un inhibidor de la ruta TOR que produce la parada del ciclo celular en la fase G1. Como se muestra en la figura 20A, las células incubadas en presencia de rapamicina aumentaron la cápsula de manera más prominente que las células incubadas en el medio inductor sin inhibidor ($p < 0,05$).

Para comprobar que la rapamicina estaba inhibiendo la progresión del ciclo celular, realizamos curvas de crecimiento en las mismas condiciones y observamos que la rapamicina indujo una reducción en la tasa de crecimiento (Figura 20 B). Por otro lado, utilizamos benomilo (1-

(butilcarbamoil)benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo), un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos que induce el bloqueo de las células en la fase M. El benomilo inhibió el aumento del tamaño de la cápsula en el medio inductor (Figura 20 C, $p<0,05$). Además, el benomilo afectó también al crecimiento de *C. neoformans* en el medio inductor de cápsula (Figura 20 D).

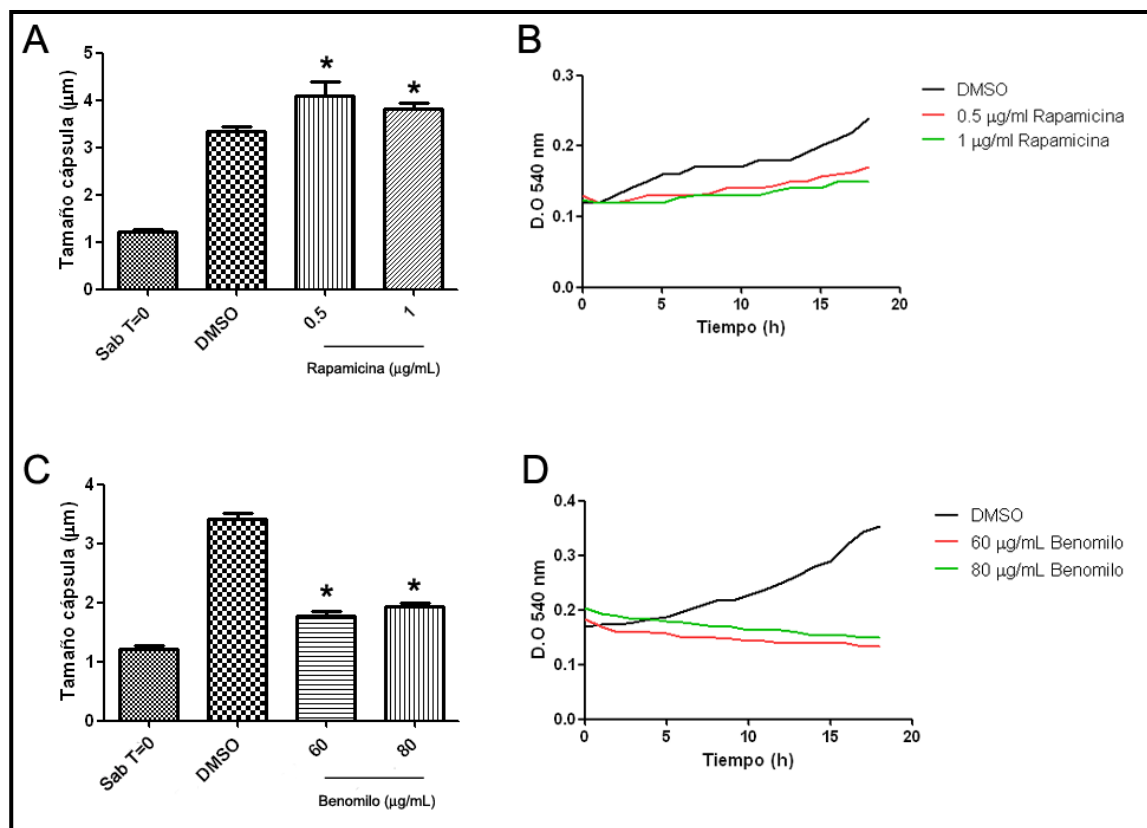


Figura 20. Crecimiento capsular en presencia de inhibidores del ciclo celular. Las barras muestran el tamaño medio de la cápsula de las células de *C. neoformans* expuestas a distintas concentraciones de rapamicina (A) y benomilo (C). Los asteriscos indican un valor $p<0,05$. Curvas de crecimiento en presencia de distintas concentraciones de rapamicina (B) y benomilo (D). Los cultivos con DMSO fueron utilizados como control.

Para descartar la posibilidad de que la inhibición del aumento del tamaño de la cápsula fuera el resultado de la muerte celular inducida por la droga, medimos la viabilidad de las células tras el tratamiento con benomilo usando ioduro de propidio. Observamos que aproximadamente el 80% de las células estaban vivas tras el tratamiento con la concentración más alta de benomilo estudiada, indicando que la ausencia de crecimiento capsular no era consecuencia de la muerte de las células (resultados no mostrados).

Así pues estos resultados indican que modulaciones del ciclo celular que causan acumulación de las células en G1 resultan en un crecimiento capsular más acusado.

3.3.- Visualización del crecimiento capsular mediante microscopía en tiempo real

Según nuestra hipótesis, el crecimiento capsular ocurre principalmente en la fase G1, con lo que este proceso debería detenerse o reducirse durante la gemación. Para validar esta idea, usamos microscopía en tiempo real para visualizar el proceso de crecimiento capsular. La cápsula, sin embargo, no es visible en condiciones normales ya que tiene un índice de refracción muy similar al del medio debido a su alto contenido en agua. El método más utilizado para la visualización de la cápsula al microscopio es la suspensión de las células en tinta china. Sin embargo, en experimentos preliminares observamos que la inducción de la cápsula en presencia de tinta china no ocurría de manera eficiente, por lo que no pudimos utilizar el método clásico en los experimentos *in vivo* en tiempo real.

Otro método para visualizar la cápsula es el basado en un fenómeno conocido como “reacción de quellung” (Evans *et al.*, 1956; MacGill *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 1995; Neill *et al.*, 1949). Este fenómeno está basado en el cambio en el índice de refracción de la cápsula que ocurre cuando se añaden moléculas que se unen a ella, como puedan ser anticuerpos monoclonales que reconocen el GXM. La cápsula recubierta de anticuerpo puede ser visualizada con microscopía Nomarski, también conocida como óptica de contraste interdifereencial (DIC por sus siglas en inglés).

Dado que el anticuerpo monoclonal IgM 13F1 induce la reacción de quellung sin afectar significativamente las propiedades mecánicas de la cápsula (Cordero *et al.*, 2013), se utilizó este anticuerpo para visualizar el aumento del tamaño de la cápsula a lo largo del tiempo (Figura 21 A, video suplementario 1).

Para ello, se tomaron fotos cada 5 minutos durante un total de 5 horas en un microscopio confocal SP5, el cual tiene acoplada una cámara que permite mantener la temperatura constante durante todo el experimento. En este caso realizamos el experimento a 37°C en placas de 96 pocillos con fondo de cristal (ver Material y métodos).

Cuando las células se transfirieron al medio inductor de cápsula, se observó un incremento en el tamaño total de la célula como resultado del crecimiento tanto del cuerpo celular como de la cápsula. El crecimiento de la cápsula ocurrió a una velocidad de 8,8 nm/min y 3,6 nm/min para el cuerpo celular (Figura 21 B). El crecimiento capsular se detuvo cuando la célula comenzó a gemar, lo cual en levaduras ocurre de manera sincronizada con la replicación del ADN en fase S (Figura 21, video suplementario 1). Curiosamente, tras la gemación, las células madre que habían inducido la cápsula siguieron nuevos ciclos de gemación, pero con una fase G1 mucho más corta, ya que la aparición de la siguiente gema ocurrió inmediatamente tras la separación de la primera célula hija. Durante esta segunda división, la cápsula no aumentó de tamaño.

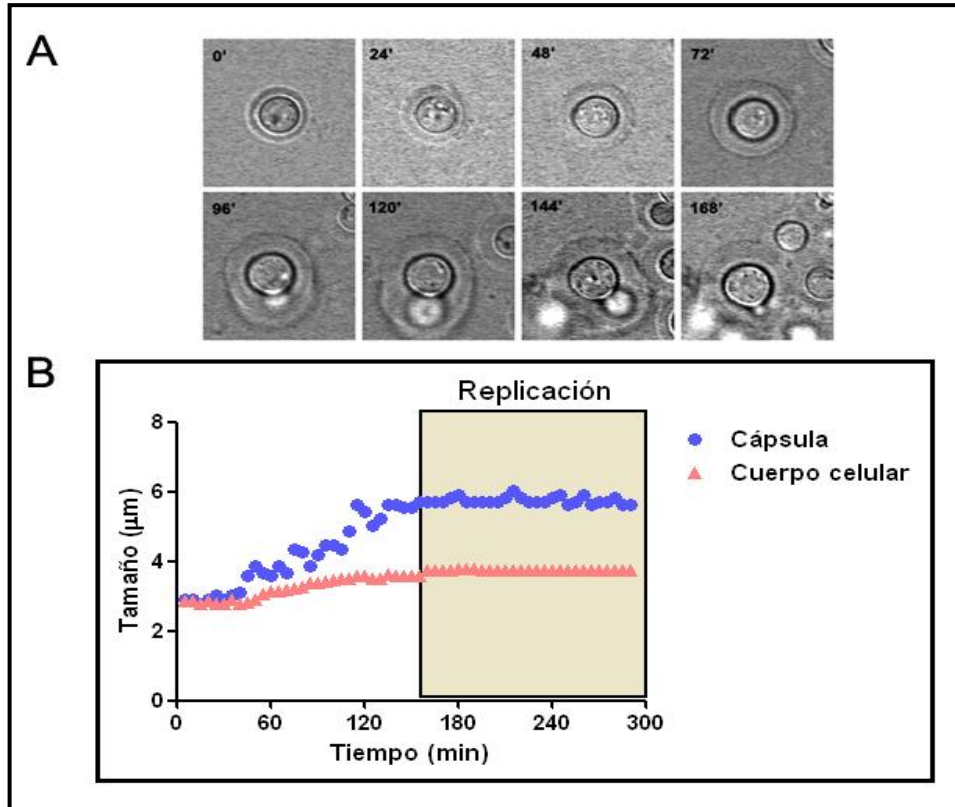


Figura 21. Crecimiento capsular visualizado mediante microscopia en tiempo real. (A) Secuencia de fotogramas que muestran el crecimiento de la cápsula. **(B)** Medidas del incremento del cuerpo celular (rosa) y de la cápsula (azul). Análisis de la velocidad de crecimiento mediante regresión lineal.

3.4.- Identificación de una ciclina G1/S en *C. neoformans*

Los resultados descritos anteriormente ponen de manifiesto una relación entre el crecimiento capsular y el ciclo celular en *Cryptococcus neoformans*. Por ello, quisimos comprobar esta relación de una manera alternativa. La progresión a lo largo del ciclo celular depende de la actividad de proteínas quinasas denominadas Cdk, cuya actividad depende de ciclinas. Así pues, mutaciones en estas ciclinas producen cambios en el ciclo celular. Por ello, quisimos investigar fenotipos capsulares en mutantes afectados en la regulación del ciclo celular, y en concreto en mutantes que tuvieran afectada la transición G1/S.

Al comienzo de este trabajo no había descrita ninguna ciclina G1/S en *Cryptococcus*. Por ello, decidimos identificar genes que codificaran proteínas que pudieran tener esta función. Aunque el ciclo celular está bien caracterizado en ascomicetos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Schizosaccharomyces pombe*), decidimos buscar genes que tuvieran homología en *Cryptococcus* con el gen *CLN1* de *Ustilago maydis*, que codifica la ciclina que regula la transición G1/S en esta levadura (Castillo-Lluva y Perez-Martin, 2005). Escogimos este gen ya que *U. maydis* es un basidiomiceto como *C. neoformans*, y pensamos que las proteínas implicadas en la regulación del

ciclo celular en *C. neoformans* serían más similares a las de *Ustilago* que a las de ascomicetos. Así pues, seleccionamos la secuencia de proteína del Cln1 de *U. maydis*, y realizamos una comparación con proteínas de *C. neoformans* disponible en la base de datos del genoma de *Cryptococcus* depositada en el Broad Institute. De esta manera, identificamos un marco abierto de lectura (CNAG_06092) anotado como una ciclina putativa. El mutante correspondiente estaba disponible en la colección de mutantes del ATCC (Liu *et al.*, 2008) disponible en nuestro laboratorio.

3.5.- Anotación de Cln1 de *C. neoformans*

En primer lugar, realizamos un análisis de la secuencia de la proteína identificada en Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). La secuencia presenta alineamiento significativo con ciclinas. En concreto presenta un dominio C-terminal y un dominio N-terminal que pertenecen al clan CL0065 o superfamilia de las ciclinas (Gibson *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1997).

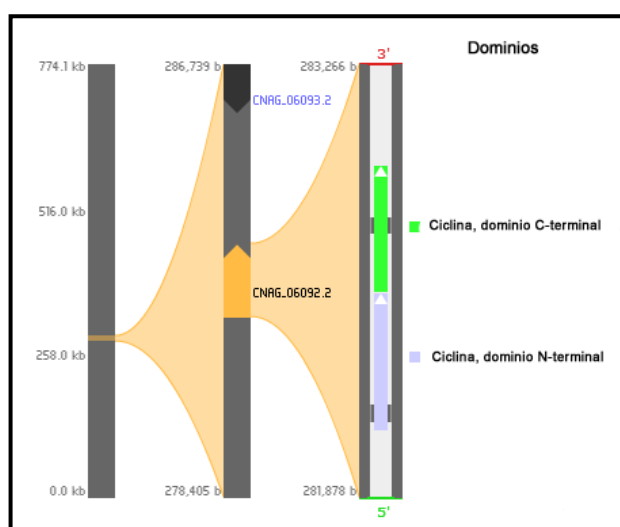


Figura 22. Esquema del marco abierto de lectura CNAG_06092 correspondiente a la ciclina Cln1 de *C. neoformans*

En paralelo, realizamos una comparación usando PhylomeDB (<http://phylomedb.org/>), un algoritmo que permite la elaboración de árboles de evolución filogenética y la identificación de genes parálogos y ortólogos (Gabaldon, 2008). Para ello, el algoritmo utilizó Ccn1 de *Candida albicans* como raíz para elaborar el árbol filogenético (marcado en rosa). Curiosamente, encontramos que aunque CnCln1 tenía similitudes evolutivas con otras ciclinas de otros organismos, esta ciclina de *C. neoformans* ha evolucionado específicamente de forma conjunta a otras proteínas presentes únicamente en otros basidiomicetos tras dos eventos de duplicación a partir de un ancestro común (Figura 23, señalada con una flecha negra).

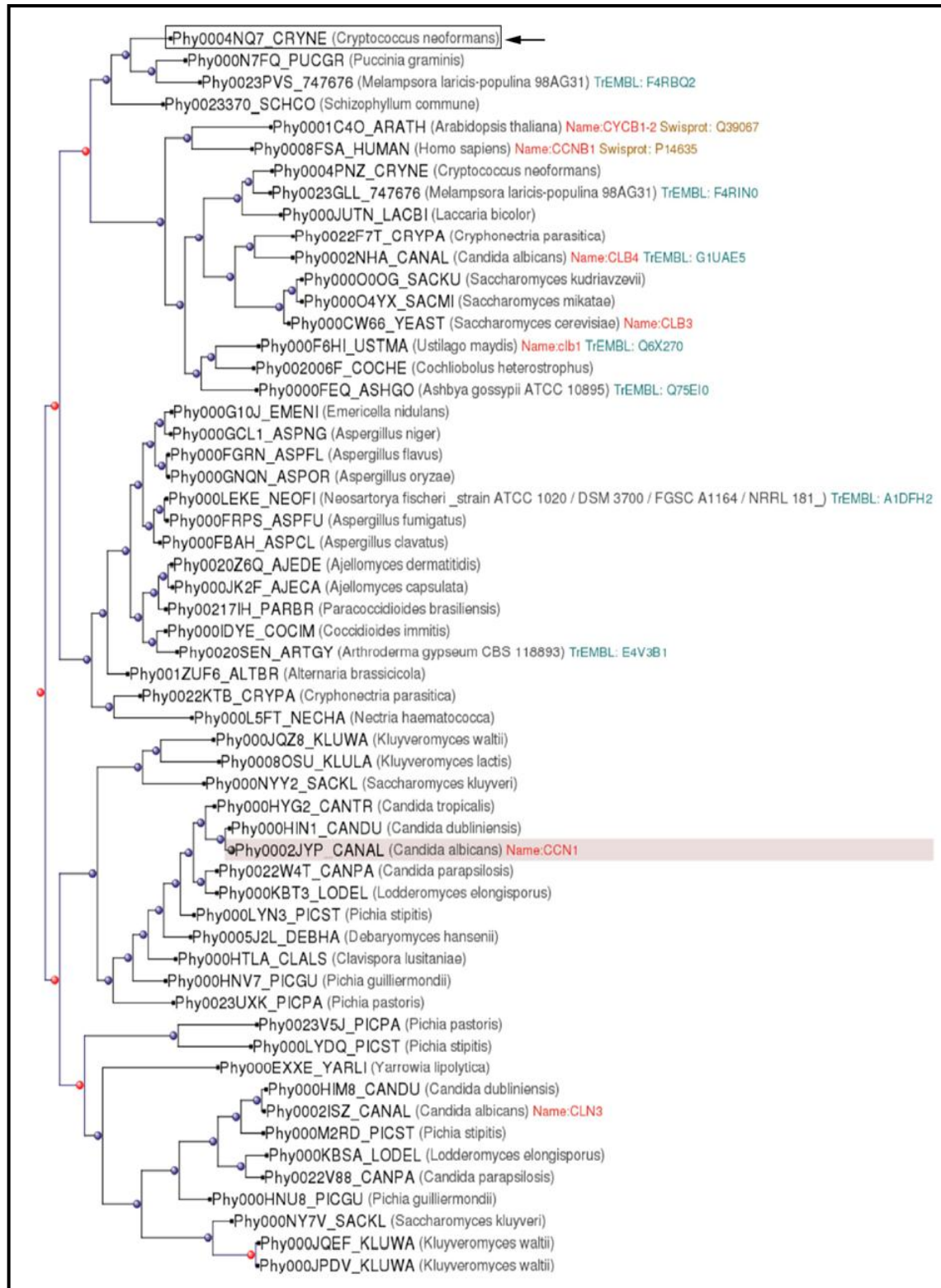


Figura 23. Árbol filogenético de evolución de la proteína Cln1 de *C. neoformans*. Se utilizó la secuencia de *Candida albicans* Ccn1 como grupo externo. La localización de Cln1 de *C. neoformans* está recuadrada y señalada con una flecha negra. Los puntos rojos indican eventos de duplicación y por consiguiente la aparición de parálogos. Los puntos azules indican eventos de especialización y por tanto, la aparición de ortólogos.

3.6.- Análisis de la longitud de la fase G1 del ciclo celular mediante microscopía en tiempo real

Con el fin de realizar una caracterización completa de dicho mutante, reconstituimos el gen silvestre en el mutante de ciclina seleccionado para el estudio. Para ello, se fusionó el gen silvestre al marcador NEO, que le confiere resistencia a la geneticina, mediante PCR de fusión (ver Material y métodos). La construcción de ADN fue integrada en el genoma mediante transformación biolística. De esta manera, pudimos realizar todo el estudio con la cepa silvestre H99, el mutante de ciclina y la cepa reconstituída.

Los mutantes de ciclina G1/S sufren un retraso en el inicio de la replicación del ADN (Irniger y Nasmyth, 1997), de forma que decidimos investigar si el mutante *cln1* sufría también un retraso en la aparición de la gema. Por ello, utilizamos microscopía en tiempo real y medimos el tiempo de crecimiento de la célula y el tiempo de gemación. Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos en medio Sabouraud líquido y a 30°C (ver material y métodos). Nos centramos en las células hijas, ya que las células madres ya han alcanzado el tamaño requerido para que progrese el ciclo celular y en ellas la fase G1 es prácticamente inexistente (Hartwell y Unger, 1977; Johnston *et al.*, 1977). El análisis de los videos mostró que más del 50% de las células del mutante *cln1* presentaba defectos de ciclo celular. Las células hijas presentaban formas aberrantes y permanecían unidas a la célula madre, siendo complicado cuantificar el tiempo requerido por estas células hijas para gemar de nuevo. El otro 50% de las células hijas conseguían separarse de las células madres y continuar con un nuevo ciclo de gemación. Sin embargo, observamos que se producía un retraso significativo en la aparición de la célula hija en comparación con la cepa silvestre (61 ± 3 minutos en la cepa silvestre vs. 98 ± 12 minutos en el mutante *cln1*; $p < 0,05$) (videos suplementarios 2 y 3).

3.7.- Características del crecimiento de la cepa mutante *cln1*

Los defectos de mutantes de ciclo celular suelen ser más acusados a altas temperaturas. Por ello, investigamos el crecimiento del mutante *cln1* a diferentes temperaturas. La cepa mutante *cln1* presentaba defectos en el crecimiento a 37°C en medio rico Sabouraud (Figura 23), lo que es característico de los mutantes de ciclo celular. Sin embargo, dicho defecto era parcialmente compensado mediante la adición de Sorbitol 1 M.

Además, observamos que en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono (YNB Glucosa) el crecimiento también se recuperaba, lo que nos llevo a pensar que el mutante *cln1* podría tener defectos en la utilización de fuentes de nitrógeno diferentes al amonio. Por ello, suplementamos el medio Sabouraud con sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ al 5%, observando que con la adición de este

compuesto a las placas de medio rico se recuperaba parcialmente el crecimiento del mutante *cln1* (Figura 24).

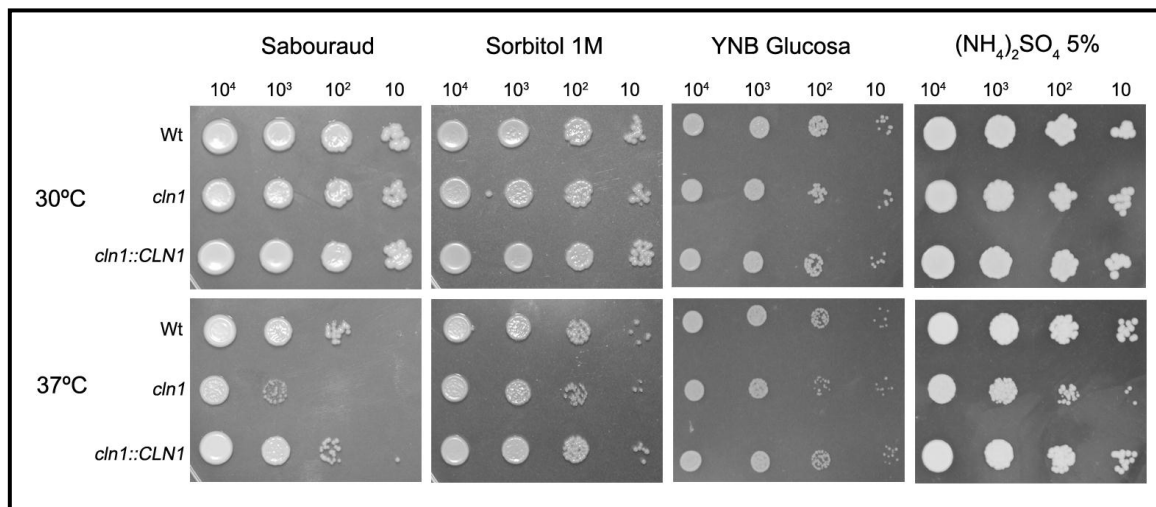


Figura 24. Los paneles superiores muestran el crecimiento de las cepas en placas de Sabouraud agar, Sabouraud suplementado con Sorbitol 1M, YNB glucosa y Sabouraud suplementado con Sulfato de amonio al 5% a 30°C y en los paneles inferiores a 37°C.

El hecho de que el mutante *cln1* presentara defectos de crecimiento que fueron revertidos por la adición de sorbitol 1M sugería que este mutante podría tener alteraciones de la pared celular. Por ello, investigamos si el mutante *cln1* era más sensible a agentes que afecten a la estabilidad de la pared celular, como por ejemplo el Rojo Congo. Como se puede ver en la figura 25, el rojo congo causó la inhibición de crecimiento del mutante *cln1* de una manera dependiente de la dosis, lo que se relacionó con posibles alteraciones de la pared celular (Figura 25).

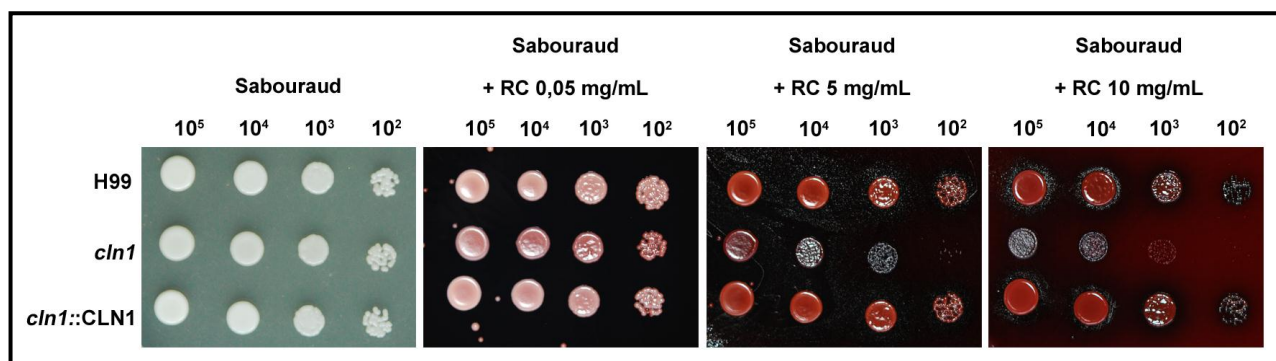


Figura 25. Crecimiento en placas con distintas concentraciones de Rojo Congo (RC). El crecimiento en Sabouraud se utilizó como control de crecimiento. Se emplearon 3 concentraciones distintas de Rojo Congo (0,05 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL). Las placas fueron incubadas 48 h a 30°C.

3.8.- Caracterización del crecimiento capsular *in vitro* del mutante de ciclina

Tras comprobar que el mutante *cln1* presentaba algunos fenotipos característicos de mutantes de ciclo celular que tienen la transición G1/S alterada (Lew DJ, 1997), investigamos si la inducción del crecimiento capsular estaba afectado. Para este propósito medimos el tamaño total de las células, el tamaño del cuerpo celular y la cápsula en condiciones de crecimiento regulares (Sabouraud líquido) (Figura 26 A) y en medio de inducción del crecimiento capsular (Figura 26 B).

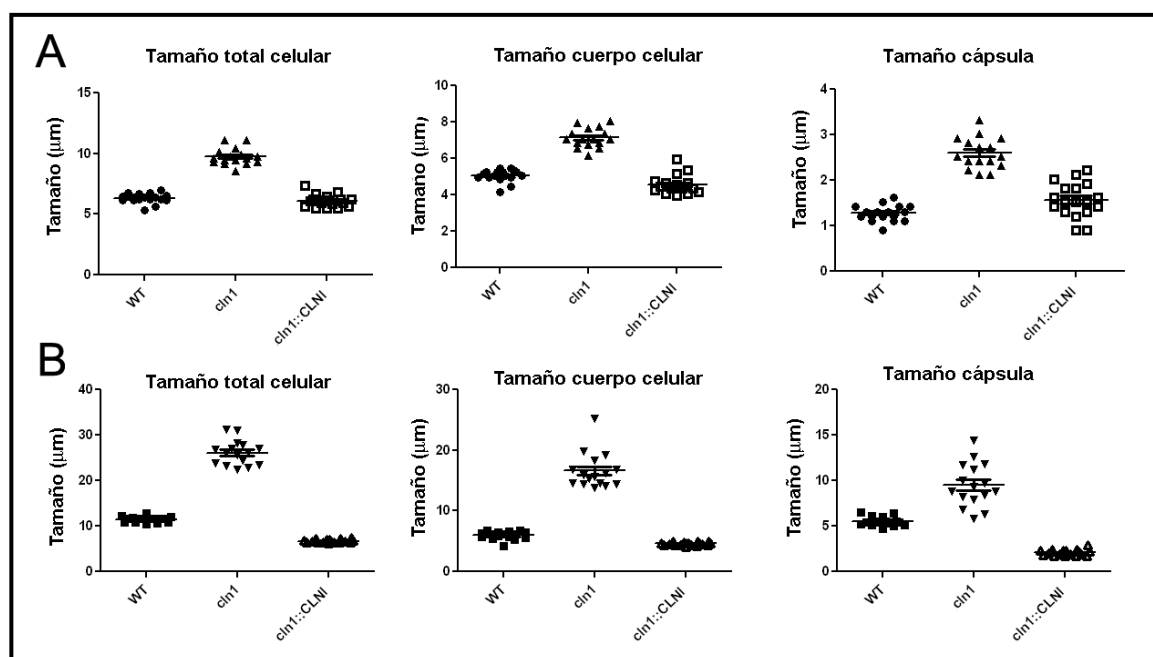


Figura 26. Crecimiento capsular *in vitro*. Crecimiento de la cápsula de *C. neoformans* H99, el mutante de ciclina *cln1* y la cepa reconstituida *cln1::CLN1* en Sabouraud (A) y en medio de inducción de cápsula (10% Sabouraud en MOPS a pH 7,3) (B).

Como se puede observar, el mutante *cln1* tenía un tamaño del cuerpo celular mayor que la cepa silvestre y la cepa reconstituida en condiciones de crecimiento regulares. Además, el mutante tenía un tamaño significativamente mayor de cápsula que las otras dos cepas analizadas cuando fue transferido al medio inductor de cápsula, sugiriendo que el tamaño de la cápsula estaba coordinado con la progresión del ciclo celular (Figura 26).

3.9.- Características morfológicas de la cepa mutante de ciclina

Además del tamaño de la cápsula, examinamos otras características morfológicas del mutante *cln1*. Estudiamos posibles diferencias en la estructura de la cápsula cuando las células habían sido incubadas en medio de inducción de la cápsula. Para ello realizamos experimentos de

inmunofluorescencia indirecta usando dos anticuerpos monoclonales IgG que se unen al GXM (18B7 y 2H1) y otros dos anticuerpos monoclonales IgM distintos (12A1 y 13F1). Sin embargo, no encontramos diferencias en el patrón de unión del anticuerpo a la cápsula en las distintas cepas (Figura 27).

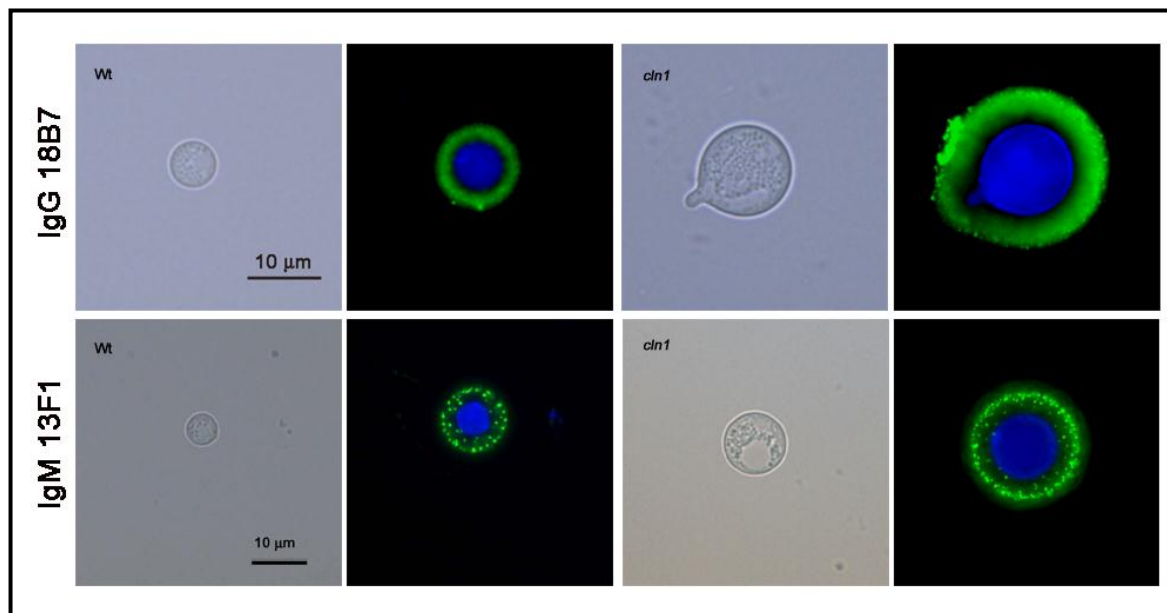


Figura 27. Inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos IgG 18B7 e IgM 13F1. En todos los paneles el cuerpo celular aparece en azul debido a la tinción con Calcofluor mientras que el patrón verde uniforme o punteado se debe a la unión de los anticuerpos IgG 18B7 o IgM 13F1 marcados con FITC respectivamente. La barra de escala en los paneles izquierdos aplica al resto de los paneles. En todos los casos la cepa reconstituída presentó el mismo patrón que la cepa silvestre (wt). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 3000B.

Estos mismos experimentos fueron realizados con células crecidas en condiciones regulares (Sabouraud líquido) y tampoco se observaron diferencias en el patrón de unión de los anticuerpos a la cápsula (resultados no mostrados).

En la pared celular de levaduras hay ácidos siálicos y a oligómeros de β -1,4-N-acetilglucosamina (GlcNAc), que son componentes de la quitina y que se unen a determinadas aglutininas, como el WGA. Pero en el caso de *Cryptococcus* se ha descrito que estas estructuras pueden prologarse también a la cápsula, y se encuentran especialmente en aquellas regiones de la cápsula por donde ha ocurrido la gemación. (Rodrigues *et al.*, 2008a). Por ello, utilizamos la aglutinina WGA para observar si estas estructuras estaban también presentes en el mutante *cln1*. Observamos que la cepa silvestre y la cepa reconstituída unían WGA en el cuello entre la célula madre y la hija. Sin embargo, en el mutante *cln1* estas estructuras estaban deslocalizadas y se encontraban por toda la célula, observándose una mayor intensidad de fluorescencia (Figura 28).

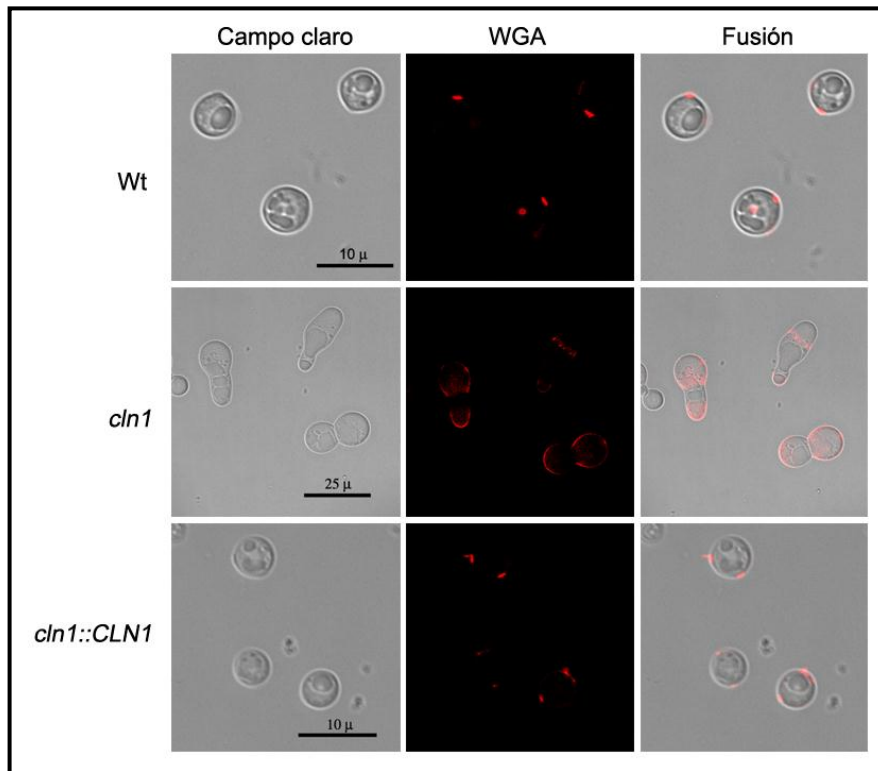


Figura 28. Tinción con WGA de la cepa silvestre (wt), el mutante de ciclina y la cepa reconstituida de cultivos de 10% Sabouraud tamponado en MOPS 50 mM a pH 7,3. El marcador WGA se une específicamente a los ácidos siálicos y a GlcNAc (color rojo). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal SP5.

Por último, realizamos una tinción con faloidina fluorescente para visualizar los filamentos de actina y observar si existía algún patrón diferencial entre la cepa silvestre y el mutante *cln1* ya que dichos filamentos participan en la replicación de las células y en los reordenamientos estructurales que se producen durante la gemación. Como se muestra en la figura 29, la tinción con faloidina proporcionó un patrón punteado a lo largo de toda la célula, sin que se observaran diferencias entre ninguna de las cepas estudiadas.

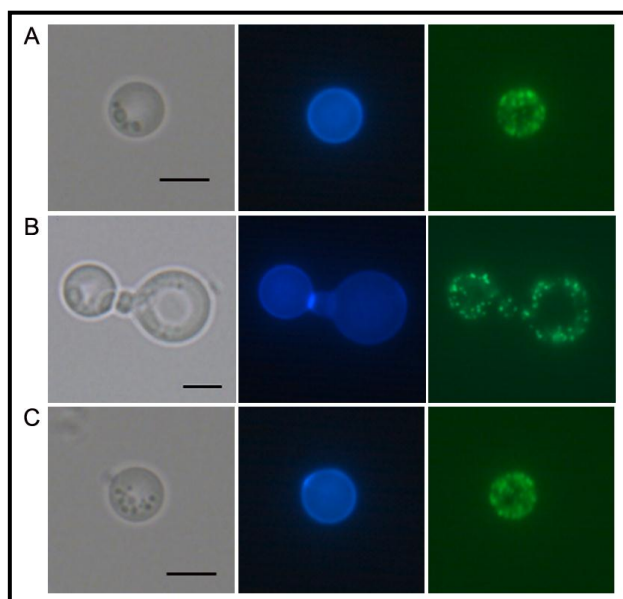


Figura 29. Tinción con faloidina. El cuerpo celular aparece teñido de azul por la tinción con calcofluor y los filamentos de actina aparecen como pequeños puntos de color verde debido a la coloración con faloidina siendo (A) la cepa silvestre, (B) el mutante *cln1* y (C) la cepa reconstituida *cln1::CLN1*. Las barras de escala de cada panel representan 10 μm.

3.10.- Análisis del perfil de proteínas diferencialmente acumuladas en el mutante *cln1* durante el crecimiento capsular

Para investigar el mecanismo por el que el mutante *cln1* inducía mayor crecimiento capsular que la cepa silvestre, comparamos los perfiles de acumulación de proteínas de estas cepas durante el crecimiento capsular. Para ello, realizamos una extracción de proteínas de cultivos de la cepa silvestre y del mutante *cln1* tras ser incubadas durante 6 horas en el medio de inducción de la cápsula (ver Material y métodos). Todo el análisis se realizó con 3 replicas independientes. Los extractos de proteínas fueron analizados mediante DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*) en el servicio de proteómica de la UCM-UPM (miembro de la red ProteoRed-ISCIII) (ver Material y métodos). Esta técnica se utiliza para estudiar diferencias en la abundancia de proteínas entre dos muestras, las cuales se marcan con fluorocromos diferentes y se mezclan en un solo tubo. Después se separan en geles de dos dimensiones los cuales se escanean y se excitan a las diferentes longitudes de onda correspondientes a los distintos fluoróforos, de modo que la diferencias de acumulación de cada proteína se detectan por la diferente señal de fluorescencia de cada mancha. Se consideró que las proteínas tenían una acumulación diferente entre las dos cepas cuando se obtuvo una diferencia de acumulación de $\pm 1,5$ veces ($p < 0,05$.) Se encontraron 30 posibles proteínas con las que se generó un mapa de colores. Para ello, los valores numéricos vuelven a transformarse en colores que representan la abundancia relativa de cada una de las machas proteicas (Figura 30).

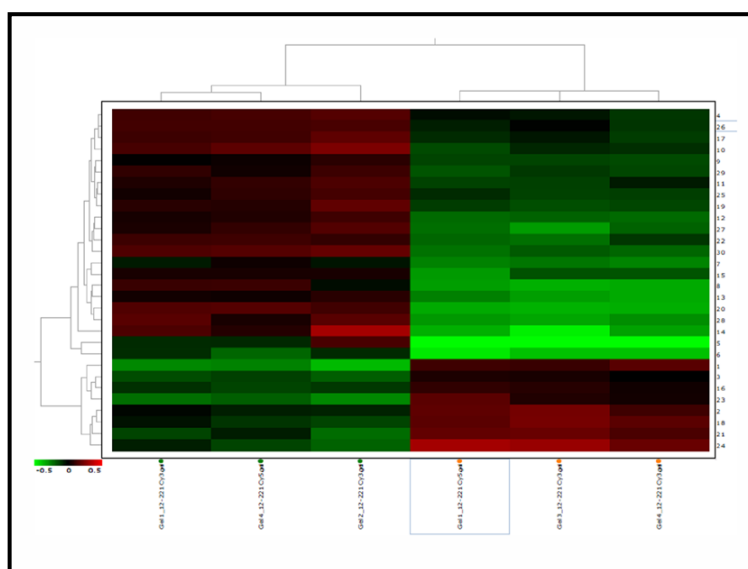


Figura 30. El dendrograma superior muestra la relación entre los geles individuales, mientras que el dendrograma lateral izquierdo muestra la relación entre las 30 manchas proteicas. El grupo de la izquierda representa los valores para el mutante de ciclina *cln1* mientras que el grupo de la derecha representa los valores de la cepa silvestre H99. Los valores de abundancia de cada una se muestran en los distintos colores. Los distintos tipos de rojo representan una abundancia relativa (*cln1*/H99) positiva mientras que los distintos tipos de verde representan una abundancia relativa negativa.

De las 30 posibles proteínas 26 pudieron ser recortadas usando el software ImageQuant v5.1 (GE Healthcare) al teñir el gel con Coomassie coloidal. Posteriormente, estas 26 manchas proteicas fueron importadas a la base de datos de Oracle que posee software DeCyder v6.5 (GE Healthcare) y 19 de ellas fueron identificadas mediante espectrometría de masas con un 4800 MALDI TOF/TOF. Finalmente, se identificó la secuencia de proteína completa tras comparar las huellas peptídicas identificadas en la espectrometría de masas con la base de datos de *Cryptococcus* (Broad Institute).

Número spot	Identificación	Relación <i>cln1</i> /H99	ORF (Base de datos de <i>C. neoformans</i>)
1040	transquetolasa	3.74	CNAG_07445
617	proteína de choque térmico (90)	3.59	CNAG_06150
2002	proteína <i>wos 2</i> (p21)	2.76	CNAG_07558
861	malato sintasa	2.54	
2228	fosfogluconato hidrogenasa	2.37	CNAG_03072
1427	aldoquetoreductasa	1.94	CNAG_01257
974	chaperona	1.92	CNAG_01750
1222	ornitina carbamiltransferasa	1.8	CNAG_02813
1062	aminotransferasa	1.79	CNAG_02853
860	malato sintasa	1.7	CNAG_05653
1149	adenilosuccinato sintasa	1.68	CNAG_02858
2227	fosfogluconato deshidrogenasa	1.67	CNAG_07561
598	proteína de choque térmico	1.59	CNAG_05199
915	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa	1.51	CNAG_02748
1133	metionina adenosiltransferasa	-1.52	CNAG_00418
584	proteína de choque térmico (70)	-1.55	CNAG_01727
532	proteína de choque térmico	-1.69	CNAG_06443
1473	proteína relacionada con la gemación	-2.08	CNAG_04194
531	proteína relacionada con la meiosis	-2.71	CNAG_00995

Tabla 5. Lista de proteínas identificadas por espectrofotometría de masas. La tercera columna muestra el valor equivalente a los cambios en número de veces entre el mutante *cln1* y la cepa silvestre H99 en las condiciones seleccionadas (incubación de 6h en medio de inducción de la cápsula a 30°C). En todos ellos obtuvimos un valor $p < 0,05$. En amarillo aparecen aquellas proteínas encontradas más abundantemente en *cln1* respecto a la cepa silvestre H99. En azul aparecen aquellas proteínas en menor abundancia en *cln1* respecto a H99. La identificación de las proteínas y su ORF (marco abierto de lectura) se llevó a cabo mediante blast proteínas-proteína con la base de datos de *C. neoformans* del Broad Institute.

Como se puede ver en la tabla 5, identificamos algunas proteínas involucradas en meiosis y gemación que son menos abundantes en el mutante de ciclina que en la cepa silvestre (H99). Sin embargo, proteínas como la malato sintasa, que participa en el ciclo del glioxilato y que le permite obtener energía a partir de ácidos grasos, así como otras proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y la xilosa (transquetolasa y aldoquetolasa) son más abundantes en el mutante de ciclina que en la cepa silvestre. La proteína *wos2*, resultó ser más abundante en el mutante *cln1* que en la cepa silvestre. Esta proteína se describió como un homólogo de p23 en *Schizosaccharomyces pombe*, que interviene en la progresión del ciclo celular, de forma que su expresión cae drásticamente cuando las células entran en fase estacionaria o se encuentran en

condiciones de limitación de nutrientes (Muñoz *et al.*, 1999). Además, aparecen distintas proteínas de choque térmico. Algunas de ellas aparecen en mayor cantidad en *cln1*, como Hsp 90, que se ha relacionado con la respuesta general de los hongos a estrés por temperatura y como proteína necesaria para la viabilidad de las células (Burnie *et al.*, 2006). En cambio otras proteínas de choque térmico aparecen menos expresadas en *cln1* que en la cepa silvestre, como Hsp70, la cual se ha relacionado con la expresión de la enzima lacasa en *C. neoformans* (Zhang *et al.*, 2006).

3.11.- Virulencia y variaciones del tamaño de la cápsula del mutante *cln1* durante la infección de *G. mellonella*

Ya que la cepa mutante *cln1* presentaba defectos en el crecimiento, analizamos su virulencia en *G. mellonella* (Figura 31). Este modelo resulta especialmente adecuado porque se puede estudiar la virulencia de las cepas a distintas temperaturas (Mylonakis *et al.*, 2005).

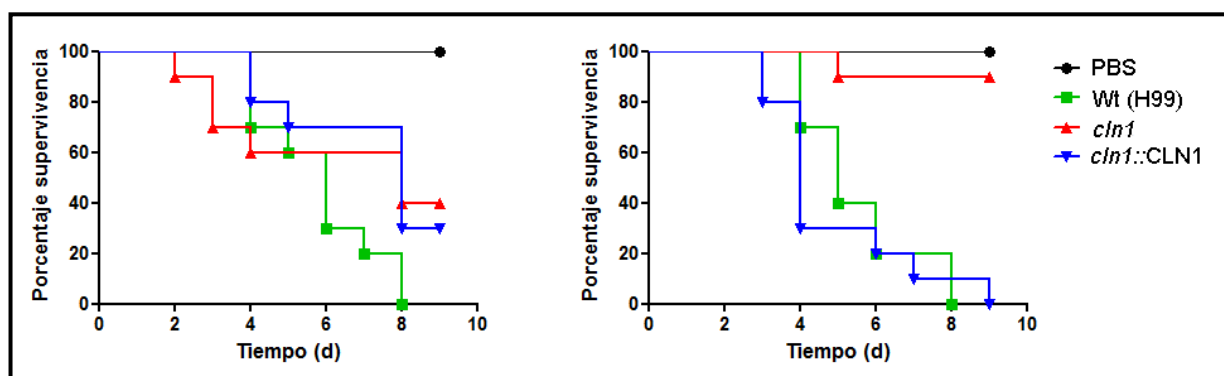


Figura 31. Curvas de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con 10^6 células/larva de las distintas cepas a 30°C (panel izquierdo) y 37°C (panel derecha).

El mutante *cln1* fué avirulento a 37°C ($p < 0,05$). Sin embargo a 30°C, no encontramos diferencias en la virulencia entre las cepas ensayadas (Figura 31).

También investigamos si el mutante *cln1* presentaba alteraciones morfológicas *in vivo*, como ya habíamos encontrado *in vitro*. Los tamaños celulares y de las cápsulas de las células del mutante *cln1* recuperadas tras 3 días de infección tanto de las larvas incubadas a 30 y a 37°C fueron mayores que los medidos en las células de la cepa silvestre H99. El incremento capsular fue mayor a 37°C que a 30°C. En todos los casos, la cepa reconstituida presentó el fenotipo de la cepa silvestre (Figura 32).

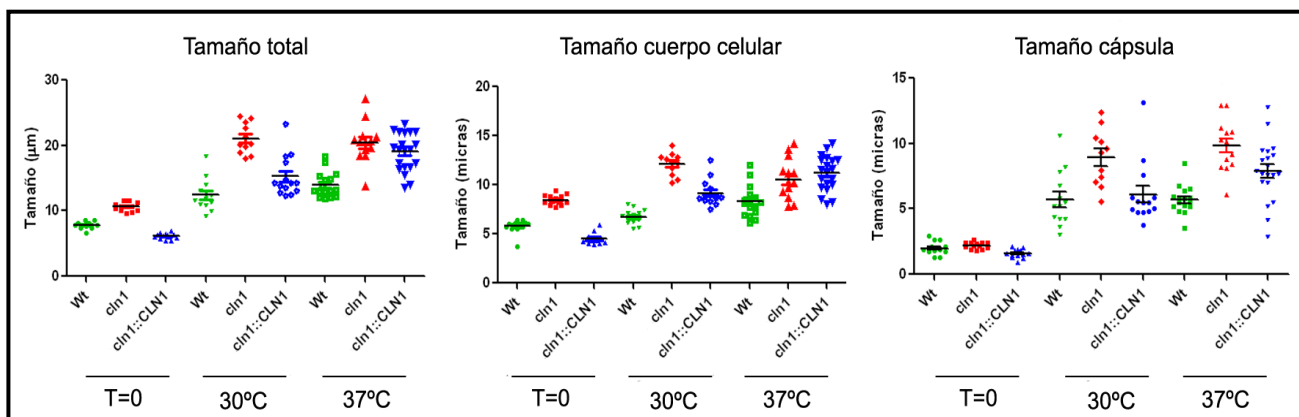


Figura 32. Distribución de los tamaños de las células recuperadas de las larvas de *G. mellonella* incubadas a 30°C y 37°C tras 3 días de infección con 10^5 células/larva.

A continuación, evaluamos el porcentaje de fagocitosis. Tras 2 horas de la administración de las levaduras a las larvas, el número de hemocitos con *C. neoformans* en su interior fue muy inferior en las larvas infectadas con la cepa mutante *cln1* comparado con aquellas infectadas con la cepa silvestre o reconstituida (Figura 33).

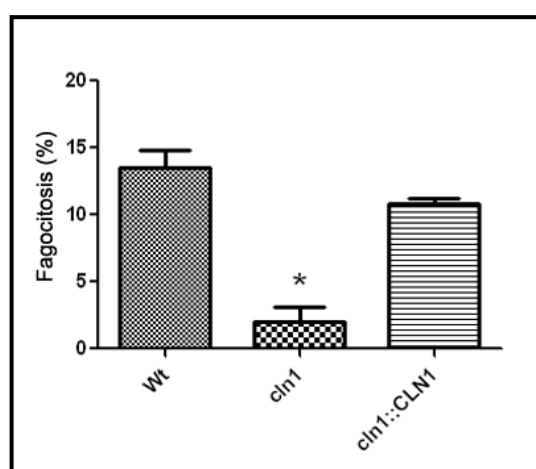


Figura 33. Porcentaje de hemocitos con células de *C. neoformans* en su interior tras 2 h de su administración. El asterisco indica un valor $p < 0,05$.

3.12.- Producción de melanina y cuantificación de la actividad lacasa de la cepa mutante *cln1*

Debido a la menor virulencia observada en este mutante de ciclina, decidimos evaluar otro factor de virulencia importante en *C. neoformans* como es la capacidad para producir melanina. La producción de melanina es necesaria para la virulencia en ratones (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Williamson, 1997), de modo que estudiamos la capacidad de estas cepas para producir y acumular

melanina en un medio con sustratos difenólicos como el medio L-DOPA tanto líquido como sólido (ver Material y métodos).

La cepa silvestre y la cepa reconstituída produjeron melanina al cabo de 3-4 días en la placas de agar L-DOPA incubadas a 30°C (Figura 34 A). Sin embargo, el mutante *cln1* no acumuló este pigmento. Este fenotipo se reprodujo cuando se realizó el experimento en medio líquido (Figura 34 B). En medio líquido la melanización de la cepa silvestre y reconstituída fue visible a los 2d.

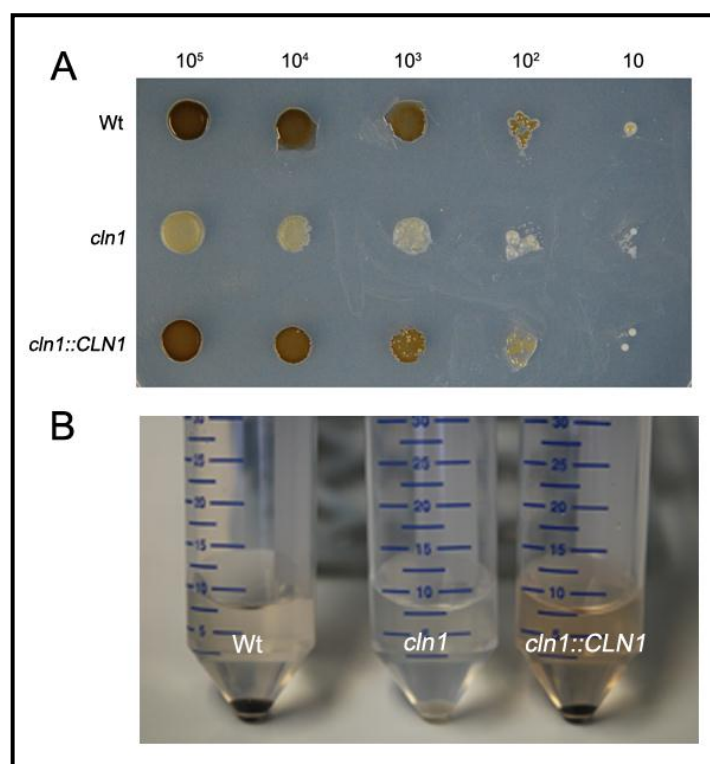


Figura 34. Producción de melanina en placas de agar L-DOPA (A) y en L-DOPA líquido (B).

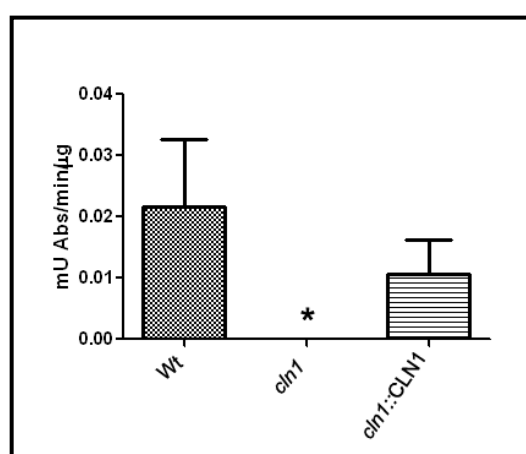


Figura 35. Actividad lacasa en presencia de una solución de 20 mM de L-DOPA. El asterisco muestra un valor $p < 0,05$.

Para profundizar en este fenotipo, inoculamos las cepas en medio de melanización y tras 2 días realizamos extractos celulares y medimos la actividad lacasa. Como se muestra en la figura 35, la actividad lacasa estaba por debajo del límite de detección en la cepa *cln1*, mientras que la cepa reconstituida presentaba niveles enzimáticos similares a los de la cepa silvestre (Figura 35).

3.13.- Sensibilidad de la cepa mutante *cln1* al estrés oxidativo producido por el peróxido de hidrógeno

La melanina confiere resistencia al daño oxidativo (Wang *et al.*, 1995), de modo que para confirmar la falta de melanización en la cepa mutante *cln1*, evaluamos la susceptibilidad de las cepas al peróxido de hidrógeno. Las células de la cepa silvestre y la cepa reconstituida incubadas en medio L-DOPA líquido durante 48 horas se mostraron resistentes al estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno a las concentraciones estudiadas (0,5; 1 y 2 mM, Figura 36). Por el contrario, el peróxido de hidrógeno indujo una reducción de la viabilidad en el mutante *cln1* de hasta 5 veces comparado con las células sin tratar (Figura 36).

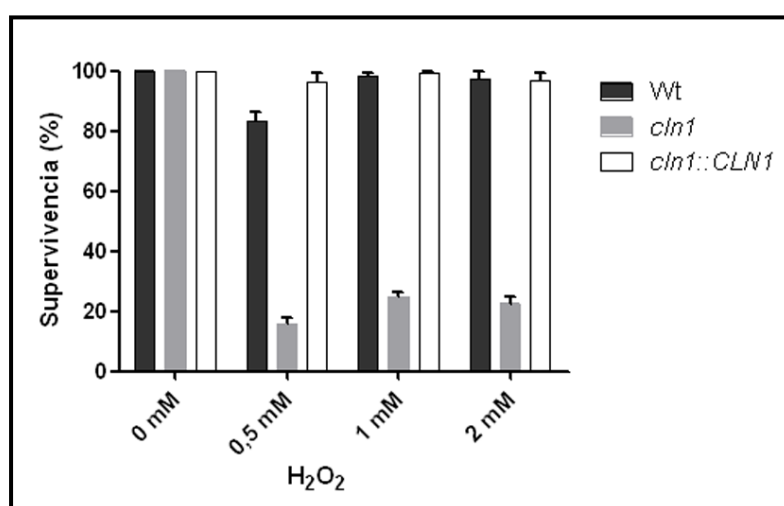


Figura 36. Supervivencia de las distintas cepas al estrés oxidativo inducido por las distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno durante 1 h.

3.14.- Producción de melanina en presencia de inhibidores del ciclo celular.

Los resultados anteriores sugieren que elementos que influyen en la regulación del ciclo celular también determinan la melanización en *Cryptococcus*. Por ello, decidimos investigar si inhibidores del ciclo celular tenían un efecto en la melanización. Utilizamos rapamicina y benomilo, que inducen parada en las fases G1 y M respectivamente, según se ha descrito en secciones

anteriores. La rapamicina inhibió la producción y/o acumulación de melanina en los cultivos con L-DOPA a cualquiera de las concentraciones estudiadas (0,5 y 1 µg/mL, Figura 37 A). En cambio, el benomilo produjo un retraso en la melanización (Figura 37 B). Sin embargo, tras 48 horas de incubación en presencia de benomilo (60 y 80 µg/mL), todos los cultivos habían adquirido la coloración oscura característica de la melanina (Figura 37 B).

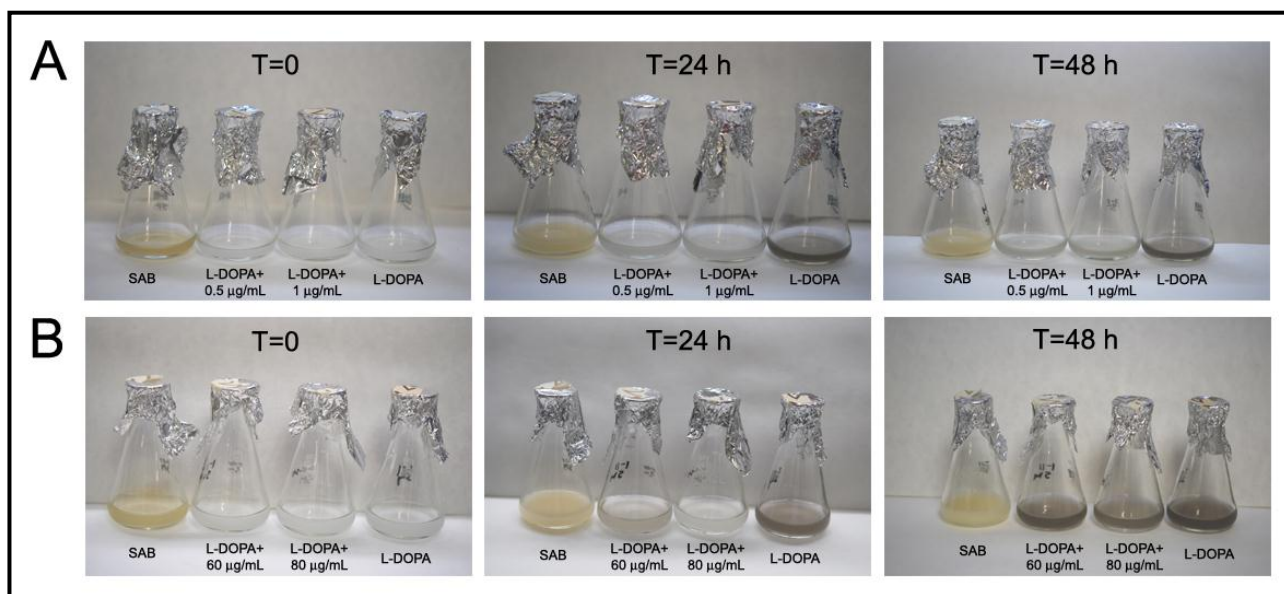


Figura 37. Cultivos de L-DOPA en presencia de inhibidores de ciclo celular. Producción de melanina en medio L-DOPA líquido en presencia de distintas concentraciones de rapamicina **(A)** y benomilo **(B)**. A los cultivos en Sabouraud (Sab) y L-DOPA (L-DOPA) sin inhibidores de ciclo celular se les añadió la misma concentración de DMSO como control.

3.15.- Curvas de crecimiento en medio L-DOPA en presencia de inhibidores del ciclo celular

Para confirmar que el efecto de la rapamicina sobre la melanización no se debía a una inhibición del crecimiento celular o a un aumento de la mortalidad, realizamos curvas de crecimiento en medio con L-DOPA en presencia de rapamicina y benomilo.

Como se puede observar en la Figura 38, la rapamicina no afectó al crecimiento en medio L-DOPA. Sin embargo, pese a que las células en presencia de benomilo si que consiguieron producir y/o acumular melanina, se observó un efecto inhibitorio del crecimiento celular en el medio L-DOPA con las concentraciones estudiadas de benomilo (Figura 38).

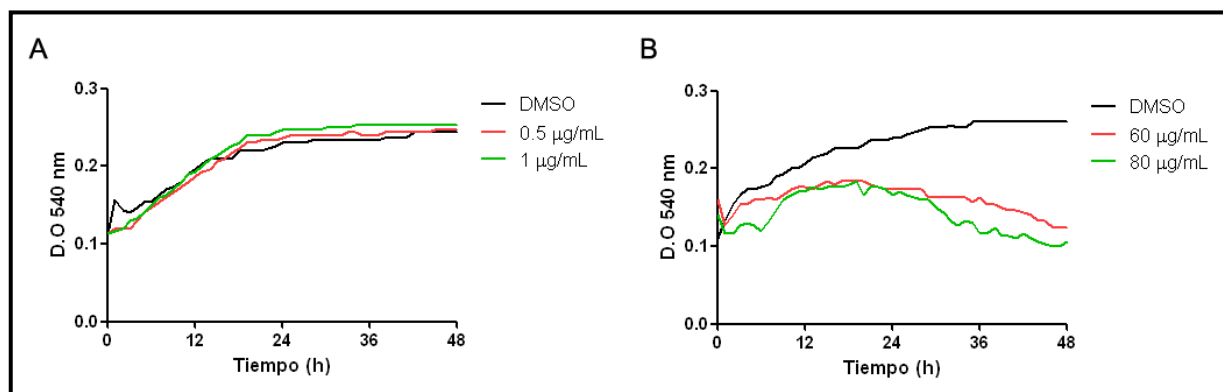


Figura 38. Crecimiento en L-DOPA en presencia de inhibidores del ciclo celular. Curvas de crecimiento en medio L-DOPA en presencia de distintas concentraciones de **(A)** rapamicina y **(B)** benomilo durante 48 horas.

3.16.- Análisis de la virulencia de las células melanizadas en *G. mellonella*

Con el fin de terminar de caracterizar el fenotipo de la melanización, decidimos evaluar la virulencia de las células melanizadas y no melanizadas en *G. mellonella* (Figura 39).

Para ello, infectamos larvas de *G. mellonella* con la cepa silvestre de *C. neoformans* crecida en Sabouraud y en medio mínimo con y sin L-DOPA. Como se muestra en la figura 39, no se observaron diferencias en la virulencia de *C. neoformans* independientemente de si las células que se emplearon para infectar las larvas estuvieran melanizadas o no.

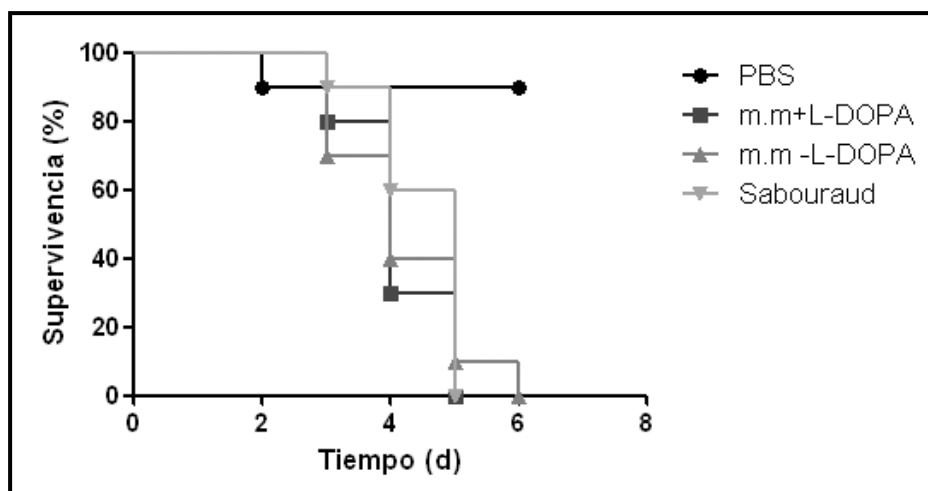


Figura 39. Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con 5.10^5 células/larva crecidas en medio mínimo + L-DOPA y medio mínimo sin L-DOPA.

Sección II: Formación de células gigantes

1. Formación de células gigantes/titanes de *C. neoformans* durante la infección

En esta sección se describirán los resultados obtenidos sobre la caracterización del segundo cambio morfológico más importante durante la interacción con el huésped de *C. neoformans*, que es su capacidad para aumentar su tamaño total, incluyendo el cuerpo celular y la cápsula, lo que da lugar a la formación de las denominadas células gigantes o titanes.

1.1.- Formación y caracterización de células gigantes de *Cryptococcus neoformans* durante la infección en ratón

El tamaño normal de las células de *C. neoformans* *in vitro* oscila entre 4-8 μm (Figura 40). Sin embargo, durante la infección en ratón, al cabo de 2-3 semanas, aparecen células de un tamaño muy superior (Figura 40). El aumento de tamaño se produjo tanto por un aumento de la cápsula, como por un aumento del cuerpo celular (delimitado por la pared celular). El cuerpo celular alcanzó 25-30 μm de diámetro, lo que supuso un aumento de casi 7 veces con respecto al diámetro del cuerpo celular de las células crecidas *in vitro*, que habitualmente tiene un tamaño de 4-5 μm de diámetro.

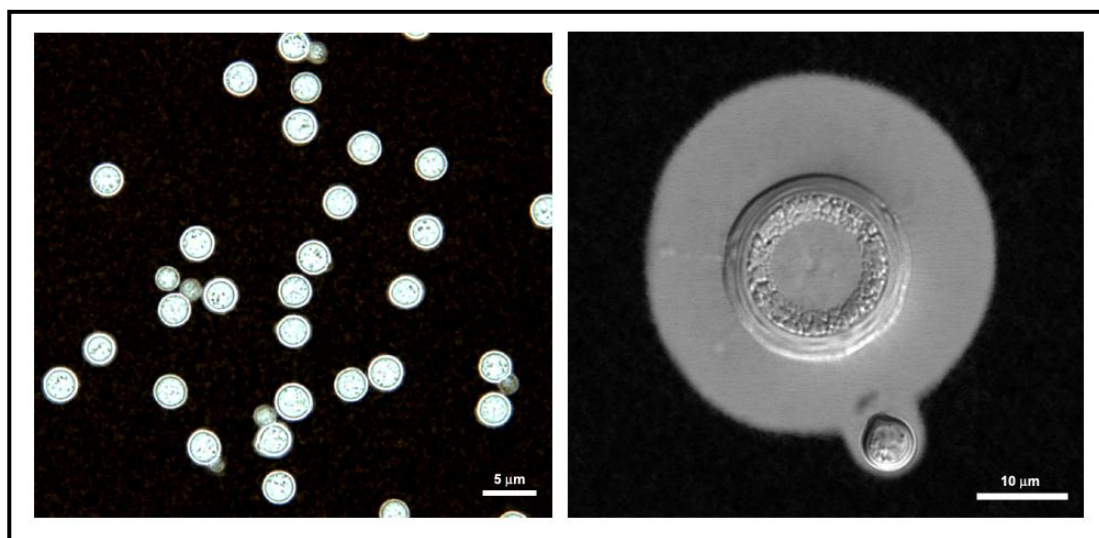


Figura 40. Células de *C. neoformans* H99 crecidas en Sabouraud (panel izquierdo) y célula recuperada del pulmón de un ratón infectado con 10^5 células de *C. neoformans* H99 3 semanas antes (panel derecho).

Este efecto fue más marcado cuando se consideró el tamaño de la cápsula en las mediciones. Las células gigantes oscilaron entre 40-60 μm de diámetro de media, aunque también se encontraron células que alcanzaron un diámetro de 70-100 μm de diámetro. Cuando se calculó el volumen de

las células, la formación de células gigantes, con un diámetro de 60 μm de media, supuso un aumento de 1700 veces el volumen celular comparado con el de las células de tamaño regular crecidas en Sabouraud, con un diámetro de 5 μm de media.

Inicialmente, realizamos nuestras observaciones con la cepa H99, pero también quisimos investigar si la producción de células gigantes se producía en otras cepas de *C. neoformans*. Empleamos para ello otras cepas de *C. neoformans* como 24067 y B3501 (serotipos D). En todos los casos se recuperaron células gigantes tras 3 semanas de infección, lo que indica que la producción de células gigantes es un rasgo general de *C. neoformans*. Del mismo modo empleamos distintas cepas de ratón para comprobar si dicho fenómeno era dependiente de la cepa del huésped. Se emplearon ratones CD1, BALB/c y C57BL/6J y pudimos confirmar que la aparición de células gigantes es un fenómeno independiente de la cepa de ratón. Por todo ello, y para simplificar el estudio, continuamos nuestros experimentos sobre las células gigantes con la cepa de *C. neoformans* H99 y definimos arbitrariamente como células gigantes a aquellas con un diámetro igual o superior a 30 μm .

1.2.- Caracterización fenotípica de las células gigantes recuperadas de ratón

Una característica peculiar de las células gigantes recuperadas de ratón es la mayor densidad de la cápsula de las células gigantes comparada a la de las células obtenidas *in vitro*. Las células crecidas *in vitro* formaron una cápsula poco densa constituida por fibras de polisacárido individuales ancladas a la pared celular (Figura 41 E). Por el contrario, las células gigantes mostraron una cápsula mucho más densa, especialmente en la región más próxima a la pared celular (Figura 41 F). Además, también se observaron zonas menos porosas, en forma de tunel, que sugieren regiones de la cápsula por las que han migrado células hija.

Además, observamos un mayor grosor en la pared celular de las células gigantes en comparación a las obtenidas *in vitro* (Figura 41 E,F), lo que pudo confirmarse al realizar microscopía electrónica de transmisión. Usando esta técnica observamos que la pared celular de las células de tamaño regular oscilaba entre 50-100 nm de ancho, mientras que en las células gigantes el grosor de la pared celular alcanzaba 2-3 μm (Figura 41 E,F).

Ya que las células gigantes presentaban una mayor densidad de polisacárido que las células cultivadas *in vitro*, investigamos si este aumento influía en la permeabilidad de la cápsula. Para ello, examinamos la localización del complemento en la cápsula. El polisacárido capsular es un activador de la ruta del complemento, y dicha activación resulta en la deposición de la proteína C3 en la cápsula, la cual puede ser visualizada mediante inmunofluorescencia indirecta. En células normales, el complemento se localiza en el interior de la cápsula cercano a la pared celular

(Zaragoza y Casadevall, 2006). Sin embargo, cuando las células gigantes se incubaron en suero de ratón, observamos que el complemento penetró hasta regiones intermedias de la cápsula, no detectándose señal fluorescente en la región más interna cercana a la pared cápsula (Figura 42).

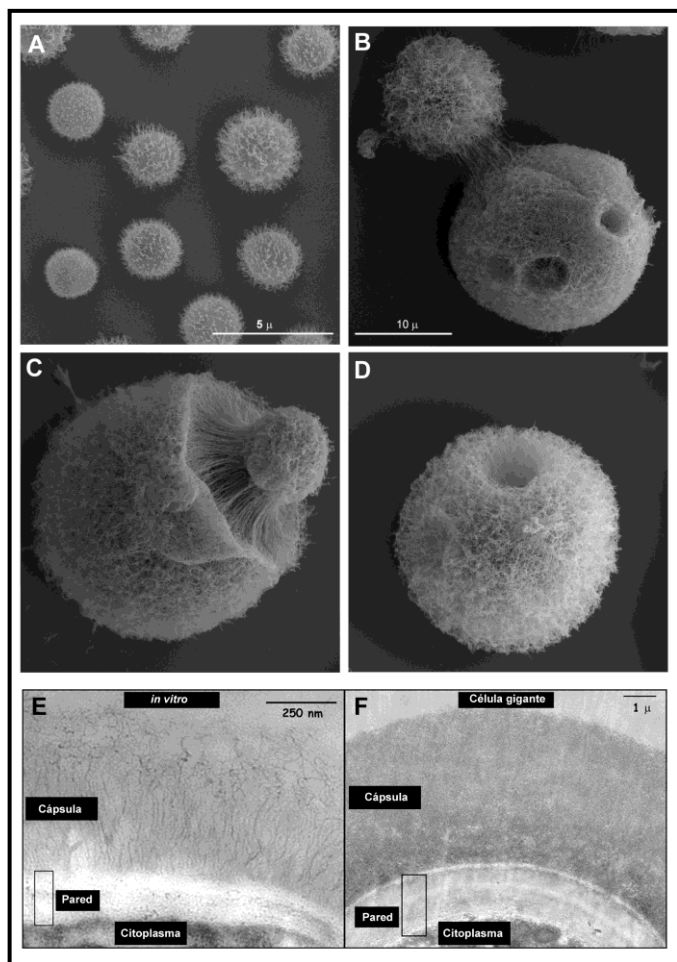
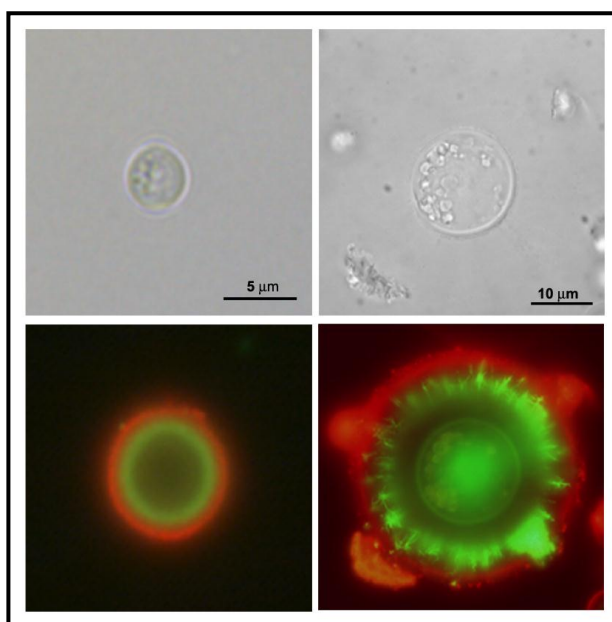


Figura 41. Caracterización fenotípica de las células gigantes. Microscopía electrónica de células crecidas *in vitro* (A) y células gigantes (B, C y D). Detalle de la cápsula y la pared celular de células crecidas *in vitro* (E) y células gigantes recuperadas de ratón (F).

Figura 42. Células recuperadas de ratón de distinto tamaño incubadas con suero de ratón y marcadas con anticuerpos anti-C3 (fluorescencia verde) y anti-GXM (fluorescencia roja). Los paneles de la izquierda muestran una célula de tamaño regular, mientras que los paneles de la derecha muestran una célula gigante.



Para estudiar si las células gigantes presentaban diferencias antigénicas en comparación con las células de tamaño regular realizamos una inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo monoclonal IgG1 18B7. Comparamos células de distinto tamaño recuperadas de pulmón de ratón para evitar la posibilidad de que factores del sistema inmune estuvieran afectando las propiedades antigénicas de la cápsula. Cuando marcamos las células con este anticuerpo, las células de tamaño regular aisladas de ratón exhibieron un anillo uniforme alrededor de la célula (Figura 43A), que fue idéntico al patrón de unión del anticuerpo observado en las células obtenidas *in vitro*.

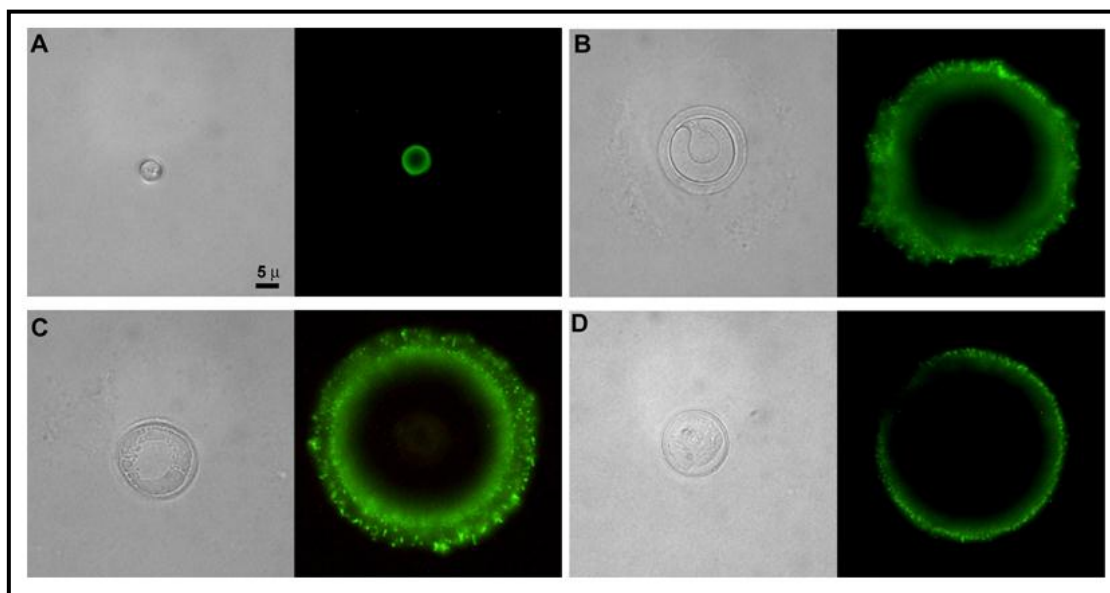


Figura 43. Inmunofluorescencia indirecta de la cápsula. Patrón de unión del anticuerpo a células de tamaño regular de *C. neoformans* H99 crecidas en Sabouraud (**A**) y a células gigantes recuperadas de pulmón de ratón (**B, C y D**).

Por el contrario, en las células gigantes, la mayor parte de la fluorescencia se localizó al borde de la cápsula, siendo difuso y en ocasiones puntuado (Figura 43 B, C y D). Algunas células mostraron un patrón de unión al anticuerpo de doble anillo puntuado (Figura 43 B, C y D).

Como se ha expuesto anteriormente, en la cápsula también se localizan residuos de ácidos siálicos y oligómeros de β -1,4-N acetilglucosamina (NAcGlc) (Rodrigues *et al.*, 2008a) de modo que quisimos investigar si dichas estructuras estaban también presentes en las células gigantes. Para ello, usamos la aglutinina WGA conjugada a Alexa 594 (ver materiales y métodos). Como se puede observar en la figura 43, en células de tamaño normal el WGA se unió al cuello entre la célula madre y la célula hija. En las células gigantes, pese a tener la misma localización, estas estructuras fueron especialmente prominentes, observándose protrusiones de varias micras de longitud dentro de la cápsula (Figura 44).

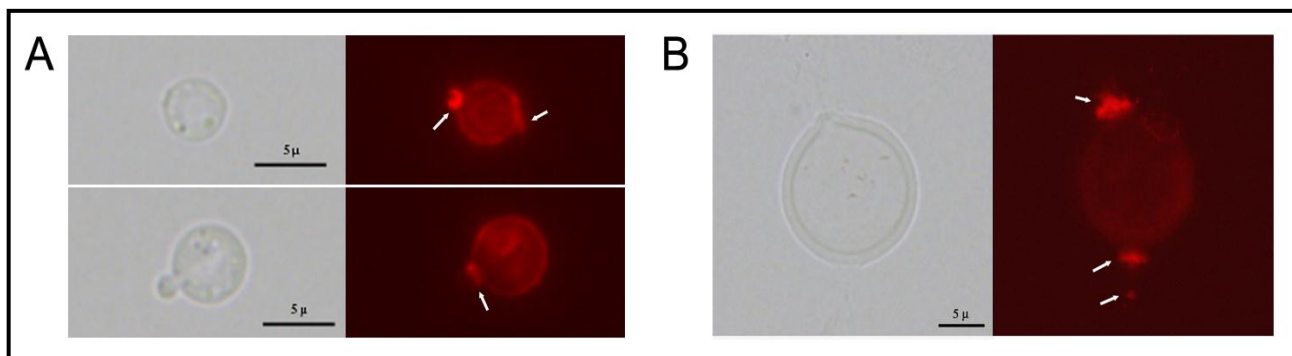


Figura 44. Tinción con WGA de células de *C. neoformans* crecidas *in vitro* (paneles izquierdos) y células gigantes aisladas del pulmón de un ratón infectado con 10^5 células de *C. neoformans* H99 (panel derecho). Las flechas blancas indican los puntos donde se unió específicamente el WGA.

A nivel intracelular, las células gigantes también presentaron características fenotípicas diferentes a las células de tamaño regular. Observamos que las células gigantes tenían un gran número de vesículas (en algunos casos, se pudieron contar hasta 50 por célula). Para identificar estas estructuras específicamente, teñimos las células con el marcador MDY-64, que se une específicamente a las vacuolas.

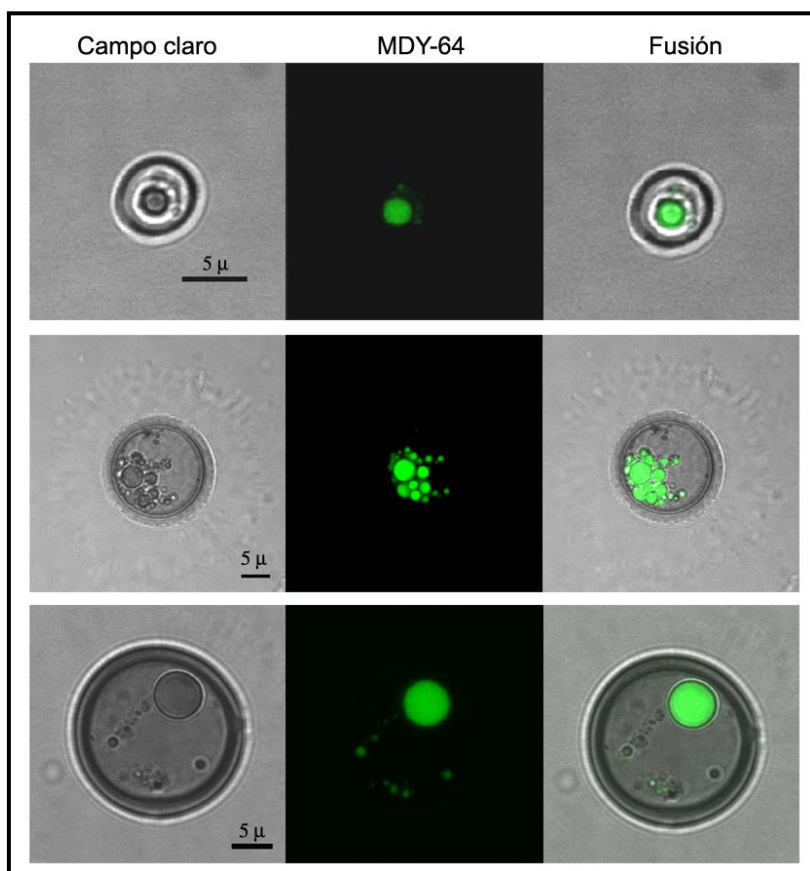


Figura 45. Tinción de las vesículas con MDY-64 de células recuperadas de pulmón de ratón infectado con 10^5 células de *C. neoformans* H99.

En células de tamaño regular observamos una única vacuola (Figura 45, paneles superiores), mientras que en las células gigantes observamos dos patrones distintos, o bien múltiples vacuolas agrupadas (Figura 45), o bien una vacuola intracelular de mayor tamaño, en ocasiones acompañada por otras de tamaño muy inferior (Figura 45).

1.3.- *Cryptococcus neoformans* forma células gigantes durante la infección de *G. mellonella*

En secciones anteriores mostramos como durante la infección en un huésped ambiental (*Galleria mellonella*), *C. neoformans* inducía el incremento del tamaño capsular. Por ello, también investigamos si en este huésped aparecían células gigantes. Cuando realizamos infecciones y analizamos la morfología de las células de *C. neoformans* al cabo de 6 días de infección, observamos una pequeña proporción de células gigantes (<5%) (Figura 46).

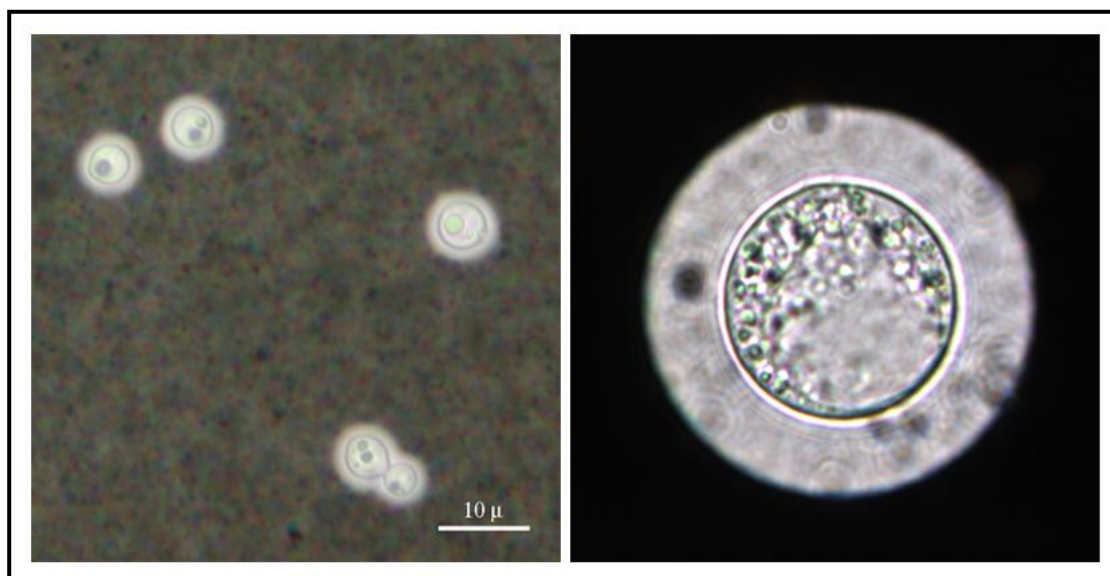


Figura 46. Suspensión de tinta china de células de *C. neoformans* crecidas *in vitro* (panel izquierda) y célula gigante aislada de una larva de *G. mellonella* tras 6 días de infección (panel derecho). La barra de escala aplica a los 2 paneles

El tamaño máximo que observamos en *G. mellonella* fue de 41 µm, lo que supuso un aumento de volumen de alrededor de 75 veces comparado con el de las células de tamaño regular. El tamaño gigante de estas células se consiguió no sólo por el incremento del tamaño de la cápsula sino también por el aumento del tamaño del cuerpo celular (Figura 46).

1.4.- Estudio de la morfogénesis de *C. neoformans* y *C. gattii* durante la infección de ratones

Como se ha descrito en la introducción, la criptococosis también puede estar causada por la levadura *Cryptococcus gattii*. La principal diferencia entre *C. neoformans* y *C. gattii* es que ésta última infecta principalmente a personas inmunocompetentes. Por ello, quisimos investigar si estas dos especies diferían en la capacidad para formar células gigantes *in vivo*. Para ello, comparamos la morfogénesis de *C. neoformans* y *C. gattii* durante la infección en ratones macho CD1. Se infectaron ratones CD1 con tres cepas de cada especie. En el caso de *C. gattii*, se incluyeron 2 cepas provenientes de los aislados del brote de Vancouver. Los ratones se sacrificaron tras 2 semanas de infección y se examinó el homogeneizado del pulmón al microscopio. Se tomaron fotos y se midieron alrededor de 200 células en cada caso.

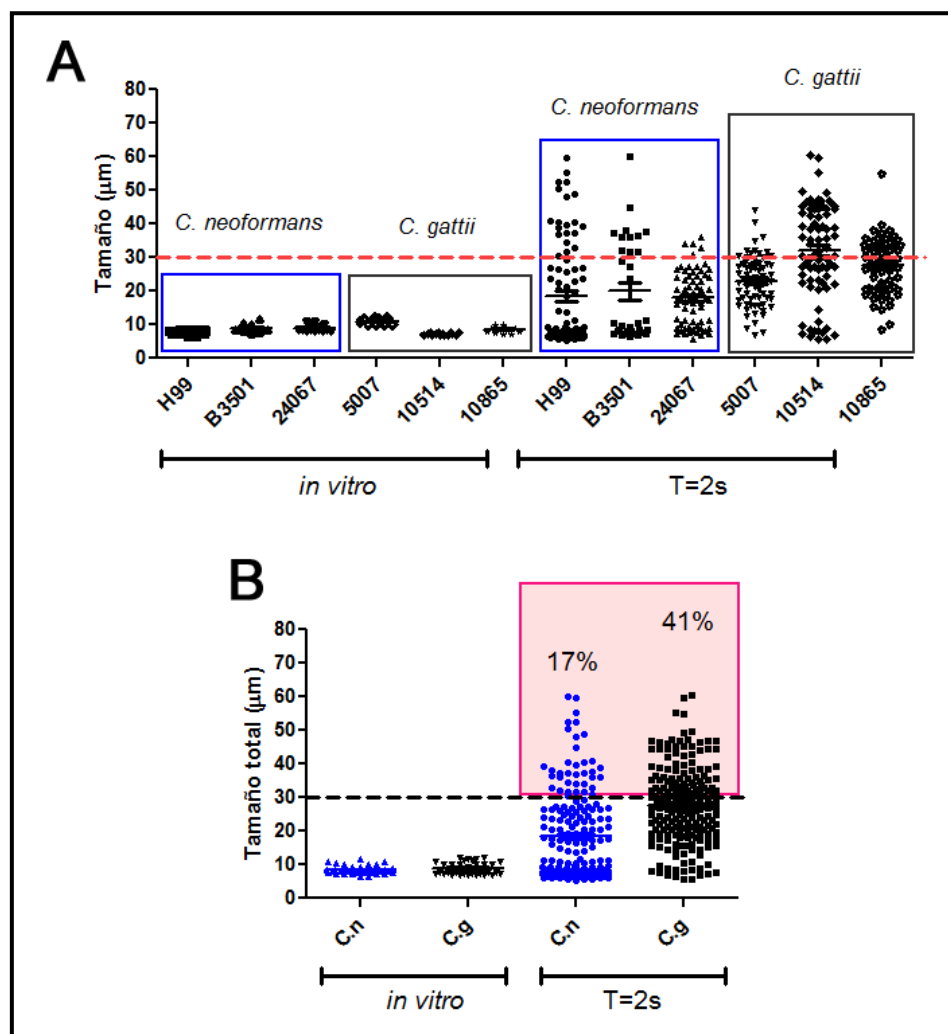


Figura 47. Morfogénesis de *C. neoformans* y *C. gattii* durante la infección de ratones macho CD1. (A) Distribución de tamaños de las células de *C. neoformans* y *C. gattii* crecidas *in vitro* en condiciones regulares (ver Material y métodos) y recuperadas de ratones macho CD1 al cabo de 2 semanas. **(B)** Formación de células gigantes en *C. neoformans* (C.n) y *C. gattii* (C.g).

Al comparar la media de los tamaños de las células crecidas en condiciones regulares *in vitro* y la de las células recuperadas del pulmón de los ratones tras 2 semanas de infección comprobamos que tanto *C. neoformans* como *C. gattii* incrementaron significativamente su tamaño en el huésped, pasando de $8,36 \pm 0,14 \mu\text{m}$ a $18,48 \pm 0,95 \mu\text{m}$ en el caso de *C. neoformans* ($p < 0,05$) y de $8,83 \pm 0,28 \mu\text{m}$ a $27,74 \pm 0,74 \mu\text{m}$ en el caso de *C. gattii* ($p < 0,05$) (Figura 47 A).

En el caso de *C. neoformans* encontramos un 17% de células gigantes en los extractos de pulmón. En cambio, en el caso de *C. gattii* este porcentaje fue del 41%, lo que indica que *C. gattii* forma células gigantes más eficientemente que *C. neoformans* durante la infección en mamíferos (Figura 47 B).

A continuación investigamos la morfología de las células gigantes de *C. neoformans* y *C. gattii*.

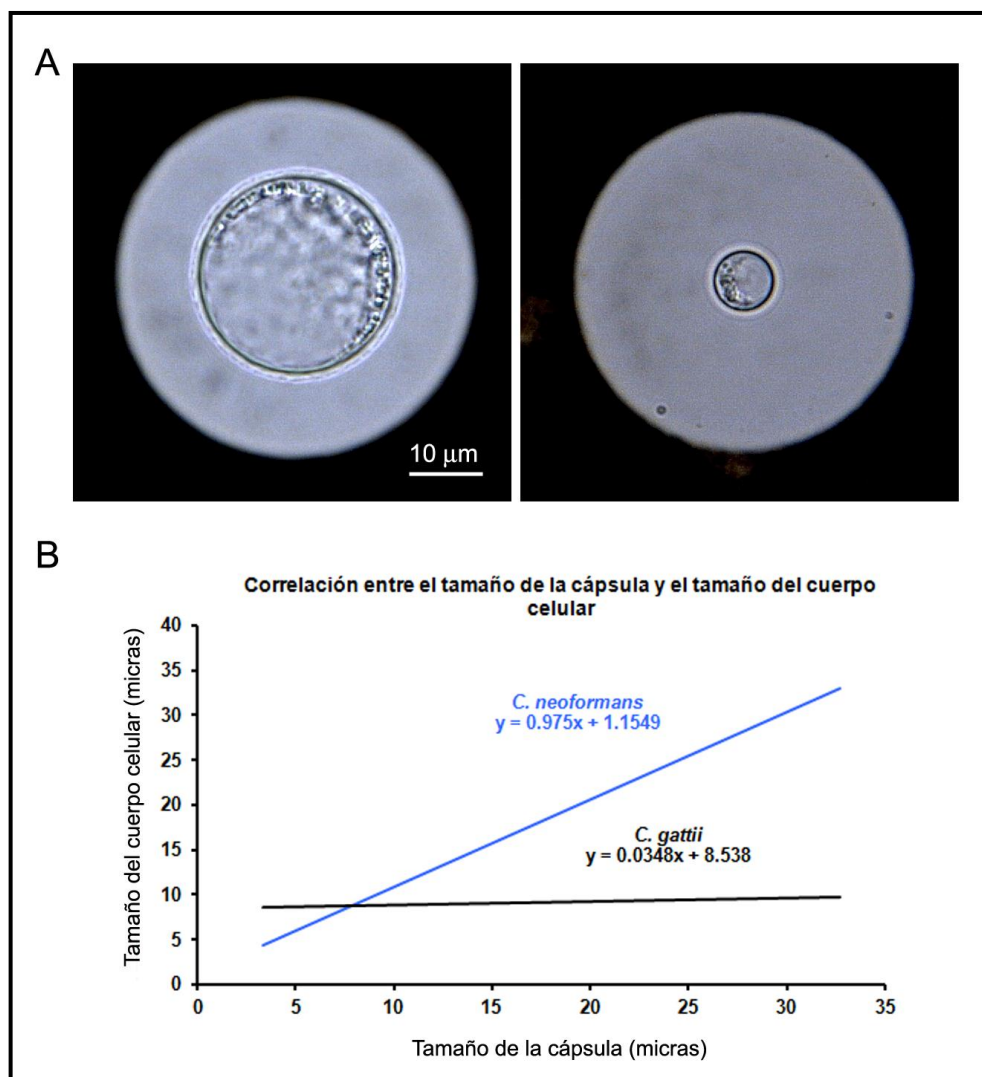


Figura 48. Diferencias en la formación de células gigantes de *C. neoformans* y *C. gattii*. (A) Células representativas de *C. neoformans* (izquierda) y *C. gattii* (derecha) recuperadas de ratones macho CD1 tras 2 semanas de infección. (B) Correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular.

Las células gigantes de *C. neoformans* se formaron por un aumento de la cápsula y del cuerpo celular (Figura 48 B). Sin embargo, en *C. gattii* las células gigantes se formaron principalmente por el aumento de la cápsula, mientras que el tamaño del cuerpo celular se mantuvo similar al de las células cultivadas *in vitro* (Figura 48A). Al analizar los tamaños de cápsula y de cuerpo celular en los conjuntos de ambas cepas, obtuvimos un coeficiente de correlación de Pearson de 0,70 para *C. neoformans* y 0,43 para *C. gattii*, lo que implica que pese a que en ambas cepas se observa una correlación positiva, sólo en *C. neoformans* se observa una correlación lineal entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular (Figura 48B).

1.5.- Estudio de la morfogénesis de *C. neoformans* y *C. gattii* durante la infección de *G. mellonella*

Para confirmar la diferencia morfológica observada entre *C. neoformans* y *C. gattii* en ratones, utilizamos también el modelo de *Galleria mellonella*. Para ello, infectamos grupos de larvas con 10^5 células/larva de 8 cepas distintas de *C. neoformans* (incluyendo cepas de la variedad *grubii* y de la variedad *neoformans*) y 9 cepas de *C. gattii*. Se analizaron los tamaños de las células recuperadas de las larvas a los 3 días de la inoculación y se comparó con el tamaño de las células cultivadas *in vitro* (Sabouraud líquido, 30°C con agitación).

Como se puede ver en la figura 49 A, en todos los casos se produjo un incremento del tamaño de la célula. En *C. neoformans*, el aumento fue de 1,8 veces ($7,9 \pm 0,13 \mu\text{m}$ *in vitro* vs $14,5 \pm 0,43 \mu\text{m}$ en *G. mellonella*). Sin embargo, el incremento fue más acusado en *C. gattii*, ya que las células aumentaron de tamaño alrededor de 3 veces ($9,3 \pm 0,20 \mu\text{m}$ *in vitro* vs $28,34 \pm 0,55 \mu\text{m}$ en *G. mellonella*, Figura 49 A).

Esta diferencia fue más notoria cuando analizamos la proporción de células gigantes formadas por *C. neoformans* y *C. gattii* en este huésped, ya que observamos que a los tres días de infección, alrededor del 40% de las células de *C. gattii* eran gigantes, mientras que en *C. neoformans* el porcentaje fue <1% (Figura 49 B).

Además, también comprobamos que las células gigantes de *C. neoformans* y *C. gattii* fueron distintas en *G. mellonella*. En *C. neoformans* hubo un aumento coordinado de la cápsula y del cuerpo celular, siguiendo una relación lineal (Figura 50). Sin embargo, en *C. gattii* todas las células gigantes aumentaron el tamaño del cuerpo celular (entorno a $15 \mu\text{m}$), momento a partir del cual, el tamaño del cuerpo celular no varió pero sí, el tamaño de la cápsula, llegado hasta un espesor de $17 \mu\text{m}$. Al analizar los tamaños de cápsula y de cuerpo celular en los conjuntos de ambas cepas, obtuvimos un coeficiente de correlación de Pearson de 0,45 para *C. neoformans* y 0,04 para *C. gattii*, lo que implica que sólo en *C. neoformans* se observa una correlación lineal positiva.

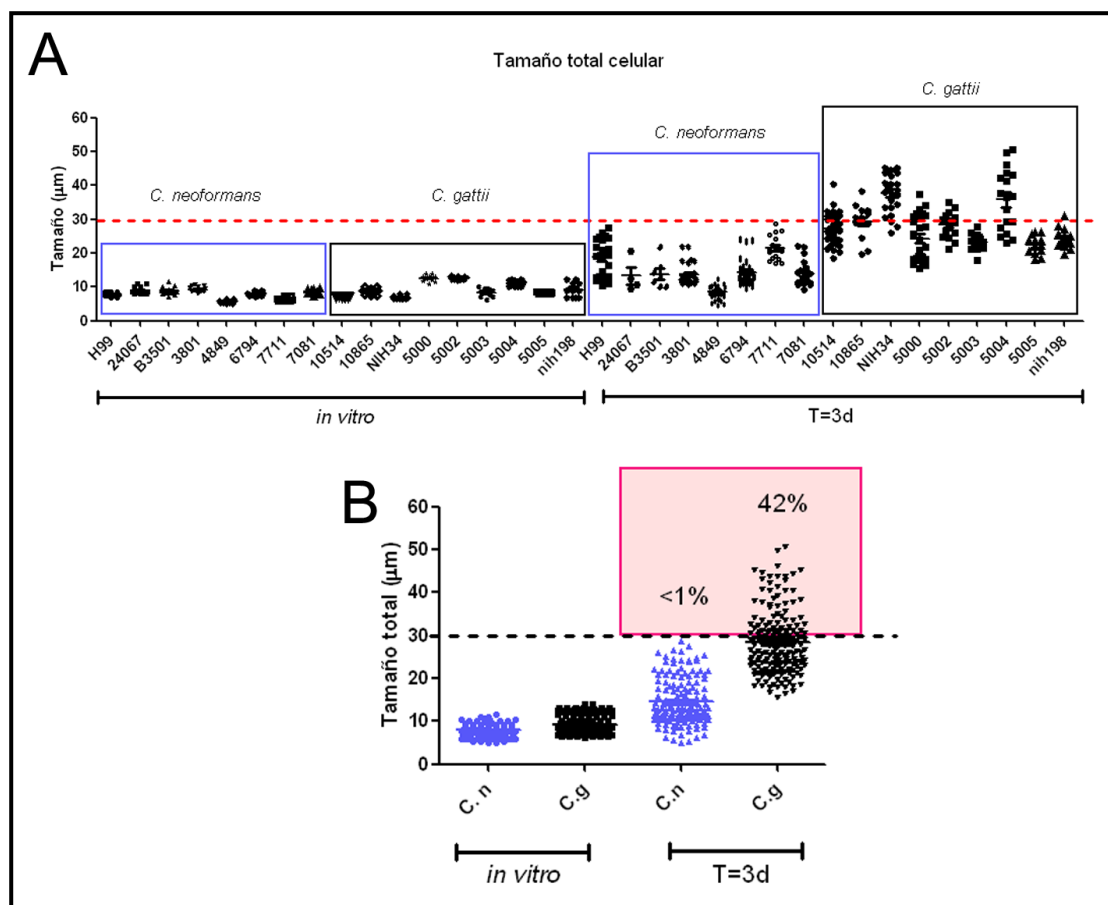


Figura 49. Morfogénesis de *C. neoformans* y *C. gattii* durante la infección de *G. mellonella*.(A) Distribución de tamaños de las células de *C. neoformans* y *C. gattii* crecidas *in vitro* en condiciones regulares (ver Material y métodos) y recuperadas de *G. mellonella* al cabo de 3 días.(B) Formación de células gigantes en *C. neoformans* (C.n) y *C. gattii* (C.g).

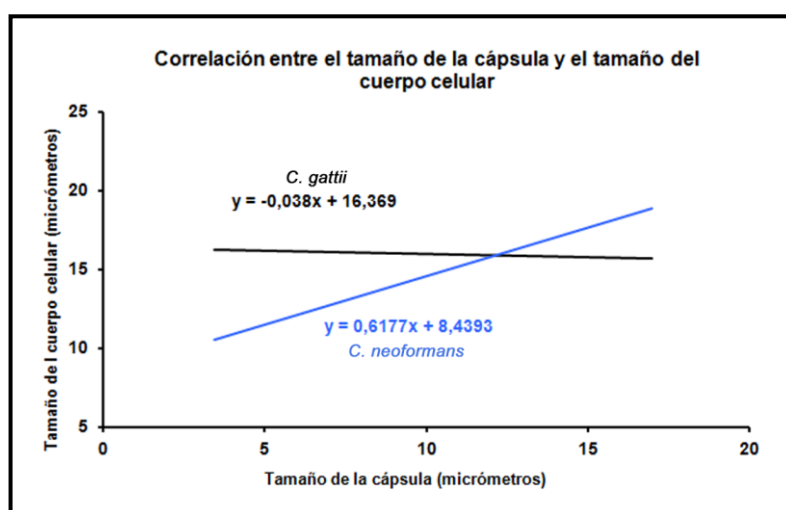


Figura 50. Correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular en *C. neoformans* y en *C. gattii*.

2. Células gigantes/titanes y su papel en virulencia

Además de caracterizar la formación de células gigantes, utilizamos diferentes estrategias para investigar su función durante la infección e interacción con el huésped. Para ello, utilizamos diferentes modelos, siendo los principales *G. mellonella* y macrófagos murinos peritoneales.

2.1.- Estudio de la virulencia de las células gigante en el modelo de *G. mellonella*

Aunque la formación de células gigantes es un fenómeno característico asociado a la infección por *Cryptococcus*, quisimos investigar si dichas células tienen capacidad de inducir infección, o si por el contrario, son formas latentes que no participan en el desarrollo de la enfermedad. Para ello, necesitamos obtener un número de células gigantes suficiente para poder realizar infecciones. En la actualidad, el único nicho del que hemos sido capaces de aislar células gigantes es el pulmón de ratones infectados. Para evaluar la virulencia de células gigantes en ratones, deberíamos infectar previamente un número de ratones demasiado alto para poder aislar una cantidad suficiente de estas levaduras. Sin embargo, utilizando el huésped de *Galleria mellonella*, sólo tuvimos que infectar y sacrificar tres ratones. Así pues, recuperamos y aislamos las células gigantes de pulmones de tres ratones infectados (3 semanas de infección). Las células gigantes fueron aisladas mediante filtración de los extractos de pulmón a través de filtros de 20 μm (ver Material y métodos). En paralelo utilizamos dos tipos de controles: células de tamaño regular aisladas de ratones (fracción de células que no quedó retenida en el filtro) y células crecidas *in vitro*. A continuación, infectamos grupos de larvas de *G. mellonella* con estos tipos celulares. Como se muestra en la gráfica, todos estos tipos de células, incluso las gigantes, mostraron la misma virulencia (Figura 51).

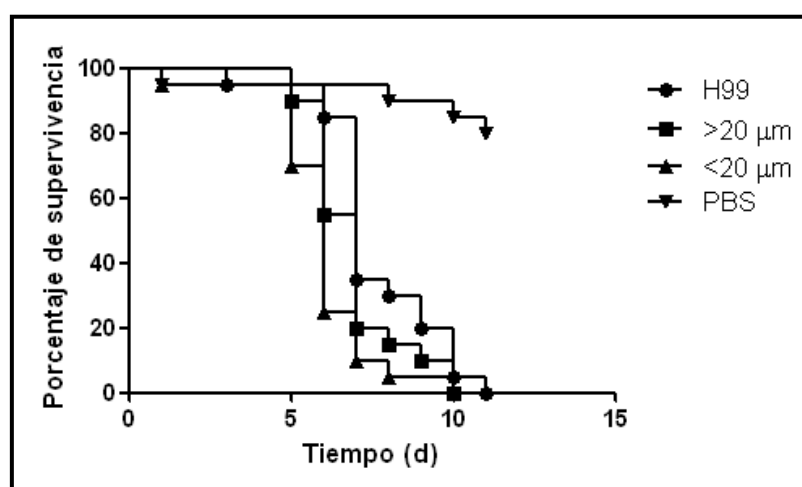


Figura 51. Curva de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con células recuperadas de ratones previamente infectados con 10^5 células de *C. neoformans* H99 y separadas por tamaños (<20 μm y >20 μm) e incubadas a 37°C. Como control se utilizaron células de *C. neoformans* H99 crecidas *in vitro* (H99).

En este experimento investigamos también la evolución de los tamaños celulares durante la infección. Para ello, recuperamos las levaduras de las larvas infectadas a distintos tiempos (2 y 5 días) y medimos sus tamaños (Figura 52).

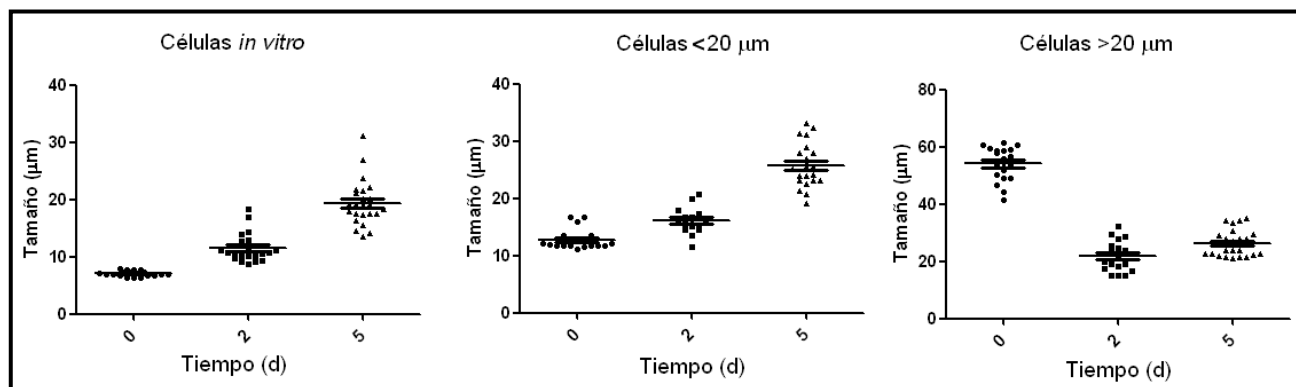


Figura 52. Distribución de tamaños de las células recuperadas de las larvas de *G. mellonella* previamente infectadas con 3×10^3 células/larva a distintos tiempos (0, 2 y 5 d).

De acuerdo a experimentos descritos en otras secciones, las levaduras obtenidas *in vitro* o de tamaño regular aisladas de ratón aumentaron su tamaño durante la infección en *G. mellonella* (Figura 52). Sin embargo, las levaduras recuperadas de larvas infectadas con células gigantes tenían un tamaño menor al tamaño de las células que se inyectaron (Figura 52). Estos resultados implican que las células gigantes son formas celulares virulentas que pueden participar en la infección y que pueden dar lugar a una progenie de células de tamaño regular.

2.2.- Interacción de las células gigantes con el sistema inmune

Los macrófagos son las células del sistema inmune cuya interacción con *Cryptococcus* se ha estudiado mejor. Por ello, quisimos caracterizar la interacción de dichas células gigantes con este tipo de células del sistema inmune. En primer lugar, realizamos experimentos de microscopia en tiempo real para observar el transcurso de la interacción entre células gigantes y macrófagos en experimentos de fagocitosis. Cuando se enfrentaron células pequeñas de *C. neoformans* a los macrófagos, pudimos observar un porcentaje muy alto de fagocitosis además de otros fenómenos previamente descritos (Alvarez y Casadevall, 2007; Alvarez y Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2007) como fusión de macrófagos tras la división, replicación intracelular y extrusión de *C. neoformans* (videos suplementarios 4,5 y 6). Sin embargo, las células gigantes no fueron fagocitadas debido a su tamaño, aunque los macrófagos sí fueron capaces de adherirse a las células gigantes (video suplementario 7).

2.3.- Patrón de citoquinas producido por macrófagos peritoneales tras la infección con células de *C. neoformans* y *C. gattii*

Dado que la interacción entre las células gigantes de *Cryptococcus* y los macrófagos es distinta a la observada con las células de *Cryptococcus* de tamaño regular, decidimos analizar el patrón de citoquinas secretado por los macrófagos.

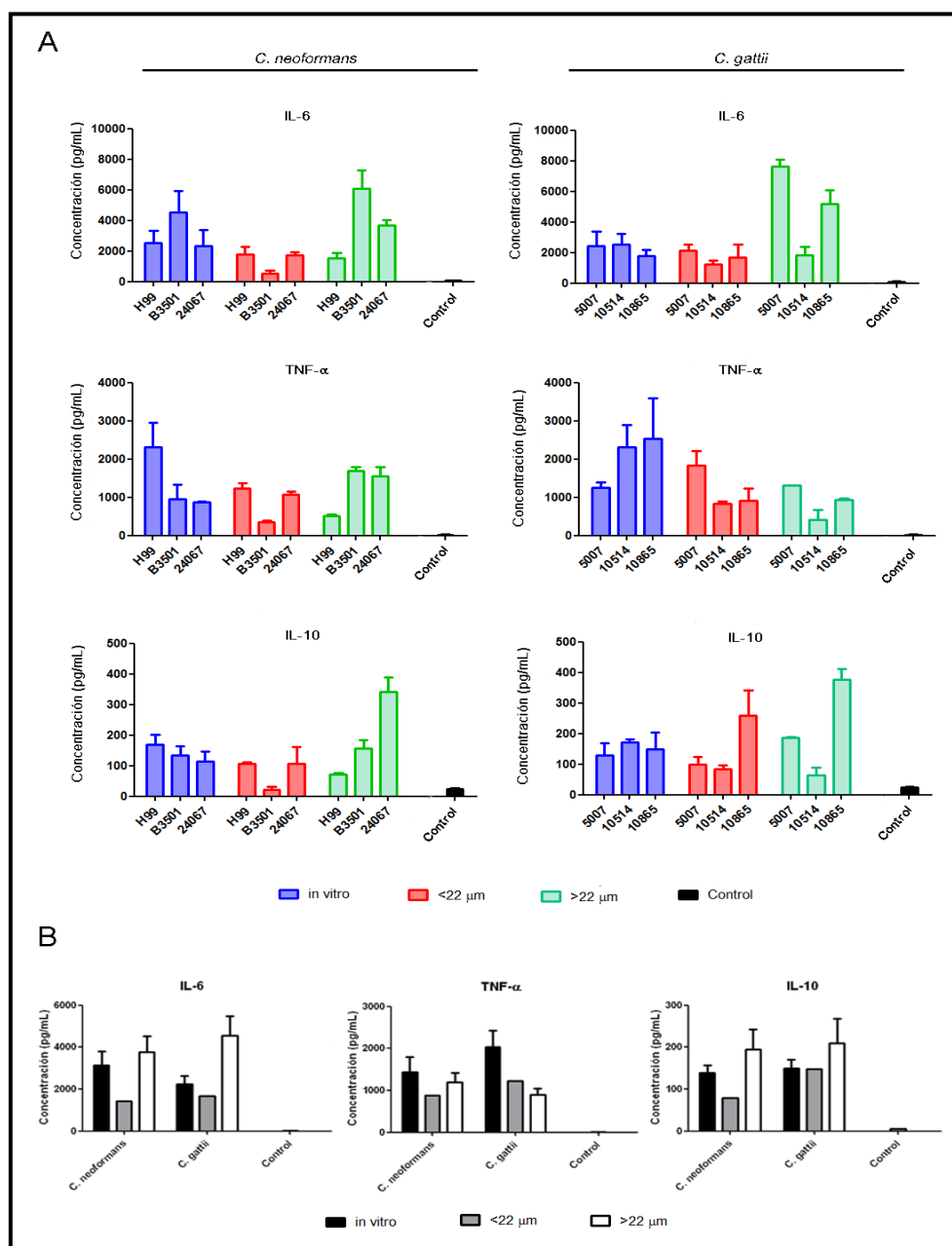


Figura 53. Patrón de citoquinas elaborado por macrófagos peritoneales de ratón tras la infección con distintas cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* (ver Material y métodos). **(A)** Producción de citoquinas por cepa. Las gráficas de la izquierda representan la media de la cantidad de cada citoquina detectada en cada cepa de *C. neoformans* y la de la derecha lo mismo pero de las cepas de *C. gattii*. **(B)** Producción de citoquinas agrupadas por especie. En todos los casos los controles representan la cantidad de citoquinas detectadas en los pocillos que contenían macrófagos no infectados.

Para ello, se emplearon macrófagos primarios peritoneales ya que en anteriores estudios habíamos comprobado su mayor respuesta en comparación a los macrófagos de la línea celular RAW264.7 (Garcia-Rodas *et al.*, 2011). Estos macrófagos se expusieron a células de *C. neoformans* y de *C. gattii* de tamaño regular (<20 µm) y células gigantes (> 20 µm) recuperadas de pulmones de ratones infectados durante 2 semanas con 5×10^5 células/ratón (ver Material y métodos). En paralelo, también empleamos células de *C. neoformans* y de *C. gattii* cultivadas *in vitro*. Observamos que todas ellas inducen la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α) e IL-10, que es una citoquina antiinflamatoria (Figura 53 A).

En todos los casos, las células gigantes (>20 µm) produjeron más IL-6 e IL-10 que las células obtenidas *in vitro*. Sin embargo, las células obtenidas *in vitro* produjeron más TNF-α que las células recuperadas de ratón. No se encontraron diferencias significativas al comparar de manera global la producción de citoquinas de *C. neoformans* y *C. gattii*. Estos resultados demuestran por primera vez que las células gigantes de *Cryptococcus* son capaces de inducir respuestas en el huésped.

Con todo ello, podemos decir que la formación de células gigantes es un elemento clave durante la infección de *C. neoformans* y *C. gattii* ya que aunque no son fagocitadas, son capaces de interactuar con el sistema inmune e inducir cambios en el perfil de citoquinas expresado por los macrófagos.

Discusión

Sección I: Incremento de la cápsula en *Cryptococcus neoformans*

1. Estudio del incremento capsular utilizando el modelo animal de *Galleria mellonella*

La virulencia de los patógenos humanos se ha estudiado clásicamente en mamíferos, siendo el ratón el modelo más utilizado. En los últimos años, se ha mostrado mucho interés por el uso de otros modelos alternativos no vertebrados, debido a los costes y las implicaciones bioéticas que supone la experimentación con modelos mamíferos. Sin embargo, el uso de estos modelos alternativos debe ser validado con el fin de comprobar si los resultados obtenidos son extrapolables a organismos más complejos. En este sentido resulta imprescindible conocer si la interacción del patógeno y el huésped no mamífero es similar a la ya conocida en modelos animales.

Las larvas de *G. mellonella* se han utilizado para el estudio de la patogénesis de distintos microorganismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* (Cytrynska *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006; Jander *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 1984). Respecto a los hongos patógenos humanos, *G. mellonella* se ha utilizado para estudiar la virulencia de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides lutzii* y algunas especies de *Aspergillus* como *A. fumigatus* y *A. flavus* (Brennan *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2010; Mesa-Arango *et al.*, 2012; Mylonakis *et al.*, 2005; Reeves *et al.*, 2004; Scorzoni *et al.*, 2013; St Leger *et al.*, 2000; Thomaz *et al.*, 2013). La respuesta inmune de las larvas frente a la infección por estos hongos es muy distinta a la observada durante la infección de células de mamíferos. Los insectos no tienen respuesta inmune adaptativa y por tanto no producen inmunoglobulinas. En cambio, los insectos tienen respuesta inmune innata, basada principalmente en la presencia de hemocitos con capacidad fagocítica (Bergin *et al.*, 2003; Brivio *et al.*, 2010; Dubovskiy *et al.*, 2008; Tojo *et al.*, 2000), lo que se asemeja a la actividad que ejercen macrófagos y neutrófilos durante la respuesta inmune innata en mamíferos. *Cryptococcus neoformans* induce un aumento de la densidad de hemocitos en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella* en las primeras 2 horas de la infección. Esta respuesta es independiente de la presencia de la cápsula. Además, dicha respuesta no se mantiene en el tiempo aunque sí requiere que las células de *C. neoformans* estén vivas. Por ello, y pese a que *C. neoformans* se encuentra en ambientes muy diferentes durante la infección de insectos y mamíferos, la utilización de estos modelos puede ayudar a entender los mecanismos que resultan en el desarrollo de la infección causada por *C. neoformans*.

Los cambios morfológicos de *C. neoformans* se han descrito durante la infección en los pulmones de ratón. Estos cambios morfológicos incluyen el incremento en el tamaño de la cápsula y la formación de células gigantes (Feldmesser *et al.*, 2001a; Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010), los cuales se piensa que son importantes para la supervivencia del hongo en el huésped.

Durante este trabajo, hemos confirmado que cambios similares a los descritos en modelos murinos ocurren durante la infección de *G. mellonella*, lo que indica que este modelo puede utilizarse para el estudio de cambios morfológicos de *C. neoformans* durante la infección. En este sentido, observamos que el incremento del tamaño de la cápsula inhibía la fagocitosis de las levaduras por los hemocitos. Una situación similar se ha observado durante la fagocitosis mediada por complemento con macrófagos de ratón (Zaragoza *et al.*, 2003b). No se puede descartar que dicho fenómeno se deba exclusivamente a que el aumento del tamaño de las células impida la fagocitosis. Sin embargo, el tamaño inicial de la cápsula no influye en la virulencia de la cepa, lo que probablemente se deba a que las células incrementan la cápsula durante la interacción con el huésped. Más aún, nuestros resultados sugieren que la fagocitosis inicial no predice el desarrollo de la enfermedad, así que las consecuencias del incremento en el número de hemocitos en la hemolinfa y el papel de la fagocitosis como mecanismo de defensa frente a *Cryptococcus* requieren más estudios. La fagocitosis de *Cryptococcus* por parte de los hemocitos aumentó cuando utilizamos una cepa acapsular (Kozel y Gotschlich, 1982; Kozel *et al.*, 1988). La cápsula inhibe la fagocitosis por parte de macrófagos de mamífero, por lo que en este caso, la fagocitosis de *C. neoformans* depende de la presencia de opsoninas, como son las proteínas del complemento o anticuerpos (ver revisión en (Zaragoza *et al.*, 2009)). Por esta razón, pocas horas después de la infección intratraqueal en ratones, la mayor parte de las células de *C. neoformans* se encuentran en el interior de los macrófagos (Feldmesser *et al.*, 2000). En *G. mellonella*, alrededor del 20% de los hemocitos contenían células de *C. neoformans* en su interior al cabo de 2 h de la infección y creemos que esta fagocitosis también se debe a opsoninas del insecto. De hecho, se sabe que en los insectos existen proteínas que reconocen patrones o epítomos de microorganismos (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) que son capaces de unirse a una gran variedad de ligandos, incluyendo lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, peptidoglicanos y β -1,3-glucanos (Wang *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 1996; Yu y Kanost, 2002; Yu y Kanost, 2000). Se ha descrito un grupo de proteínas que contienen tioésteres y actúan como opsoninas en *Drosophila melanogaster* y en *Anopheles gambiae* (Lagueux *et al.*, 2000; Moita *et al.*, 2005). En *G. mellonella*, la proteína GmPC8 que actúa como opsonina al menos para *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Candida albicans* (Kim *et al.*, 2010). Además, no se conocen en los lepidópteros receptores de membrana implicados en la fagocitosis, como por ejemplo la familia de receptores *scavenger*, lo que sugiere que probablemente utilicen distintas opsoninas para la fagocitosis de distintos microorganismos en lugar de receptores de membrana (Kim *et al.*, 2010).

El crecimiento capsular de *C. neoformans* durante la infección en *G. mellonella* se correlaciona con diferencias en la virulencia de *C. neoformans*. En *G. mellonella*, *Cryptococcus* es más virulento a 37°C que a 30°C (Mylonakis *et al.*, 2005). Esta diferencia de virulencia no se explica por un mejor crecimiento de la levadura a 37°C, ya que *Cryptococcus* crece mejor a 30°C. Sin embargo, la mayor virulencia a 37°C se correlaciona con un mayor incremento del tamaño de la cápsula a 37°C.

Estos resultados concuerdan con anteriores estudios que demostraron que el incremento del tamaño de la cápsula *in vitro* ocurre más eficientemente a temperatura fisiológica (Zaragoza *et al.*, 2006). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el aumento de la cápsula es importante para la supervivencia en *G. mellonella*.

El incremento del tamaño de la cápsula en *G. mellonella* se asoció a una disminución de la permeabilidad de la misma, lo que puede tener implicaciones en la interacción del patógeno con el huésped. Un aumento de la densidad de la cápsula puede afectar a la penetración de moléculas con actividad antifúngica, como son péptidos antimicrobianos producidos por la respuesta humoral de *G. mellonella*. El aumento de la densidad de las fibras de polisacárido de la cápsula se ha descrito tanto durante la infección en ratones (Charlier *et al.*, 2005; Gates *et al.*, 2004), como *in vitro* (Maxson *et al.*, 2007b; Pierini y Doering, 2001; Zaragoza *et al.*, 2006), y se ha asociado al envejecimiento de las células (Maxson *et al.*, 2007b). Nuestros resultados sugieren que la capacidad de modular cambios estructurales en la cápsula contribuyen también a la evasión de la respuesta inmune de *G. mellonella* y por lo tanto, contribuyen a promover la supervivencia de *Cryptococcus*.

El mecanismo molecular que permite el incremento de la cápsula es desconocido. Una característica de este fenómeno es que ocurre en condiciones de crecimiento con escasos nutrientes, donde normalmente la tasa de replicación de la levadura está disminuida. Sin embargo, pensamos que el crecimiento capsular está también potenciado por factores propios del huésped. Estudios anteriores han demostrado que fracciones lipídicas polares de amebas y macrófagos inducen el crecimiento capsular (Chrisman *et al.*, 2011). En el caso de la interacción entre *Cryptococcus* y *G. mellonella*, encontramos resultados similares, confirmando que fosfolípidos polares inducen el crecimiento capsular. Sin embargo, en estas condiciones, la tasa de crecimiento también se vio disminuida, de modo que de momento no se puede discernir si el incremento capsular se debe a la presencia de un lípido polar específico, o de nuevo a una reducción de la tasa de crecimiento. El hecho de que este fenómeno se conserve en huéspedes no vertebrados implica que el reconocimiento de fosfolípidos es una respuesta general adquirida y conservada por *C. neoformans* en distintos huéspedes.

Nuestros resultados tienen implicaciones también sobre el origen de la virulencia de *Cryptococcus*. Diversos estudios han demostrado como los factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de la enfermedad en mamíferos, como la cápsula o la melanina, son también necesarios para la infección en huéspedes ambientales. Por ello, se ha propuesto que la interacción con predadores ambientales ha supuesto una presión para seleccionar características que le permiten sobrevivir durante esta interacción y que también proporcionan ventaja durante la infección en mamíferos. En este sentido, nuestros resultados sugieren que la morfogénesis también juega un papel en interacciones ambientales, y que puede haber sido seleccionada por *Cryptococcus* para evitar la muerte por huéspedes como insectos, amebas o nematodos. *Cryptococcus* puede infectar y causar

enfermedad también en plantas (Staib *et al.*, 1972; Warpeha *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2007), lo cual ofrece otro nicho de interacción ambiental en el que *Cryptococcus* ha podido desarrollar estrategias de defensa frente a agentes antimicrobianos. Por todo ello, el uso de *G. mellonella* como huésped supone en este trabajo un gran avance, no sólo porque nos ofrece una herramienta sencilla para investigar la morfogénesis *in vivo*, sino también por las implicaciones evolutivas que se han planteado.

2.- Identificación de mecanismos moleculares que regulan el crecimiento capsular

Aunque la cápsula es la estructura más estudiada de *C. neoformans*, los mecanismos moleculares involucrados en su síntesis y regulación de su tamaño permanecen desconocidos. Se conocen algunos genes necesarios para su síntesis, como son los genes *CAP* (Chang y Kwon-Chung, 1994; Chang y Kwon-Chung, 1998; Chang y Kwon-Chung, 1999; Chang *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1995), pero la función exacta de estos genes sigue siendo desconocida. Más aún, las rutas y los mecanismos moleculares que se desencadenan durante el crecimiento de la cápsula durante la interacción con el huésped son también desconocidos. Por ello, en este trabajo planteamos diferentes abordajes para identificar los mecanismos moleculares que regulan el crecimiento capsular. En el primero de ellos, intentamos identificar en el genoma de *C. neoformans* genes que podrían estar involucrados en la síntesis y crecimiento de la cápsula. Además, hemos tratado de demostrar una hipótesis que planteamos sobre el crecimiento capsular, en la que propusimos que el aumento de la capsula ocurre en la fase G1 del ciclo.

2.1.- Abordaje genómico para la identificación de genes involucrados en la cápsula

El abordaje genómico se basa principalmente en dos premisas: 1) Ya que la cápsula es una estructura presente sólo en *Cryptococcus*, pensamos que deben existir genes involucrados en su síntesis que estén sólo presentes en este género y no en otros hongos. 2) En segundo lugar, buscamos genes que hubieran evolucionado de forma conjunta a los genes *CAP*, ya que genes que evolucionan conjuntamente suelen tener funciones similares (Chen y Jeong, 2000; Gabaldon, 2008). Con todo ello, mediante un abordaje genómico realizado en colaboración con el grupo del Dr. Toni Gabaldón, mediante la comparación de 60 proteomas de hongos, obtuvimos una lista de posibles candidatos que cumplieran alguna de las dos premisas.

Todos los mutantes analizados crecieron a 37°C y acumularon melanina de forma similar a la cepa silvestre, por ello nos centramos en las diferencias observadas tanto en morfogénesis de la cápsula como en virulencia.

Encontramos que en algunos de los mutantes analizados existe una correlación entre la incapacidad para incrementar el tamaño de la cápsula y defectos en la virulencia. Entre ellos, los

mutantes *cap60*, (CNAG_00600), *cas35* (CNAG_00746) y *liv11* (CNAG_05422) ya habían sido caracterizados como deficientes en la síntesis de la cápsula (Chang y Kwon-Chung, 1998; Liu *et al.*, 2008; Moyrand *et al.*, 2004), lo que demuestra la validez de nuestra estrategia. Pero también encontramos otras tres proteínas con función desconocida (CNAG_01506, CNAG_00506 y CNAG04788) y origen único en *Cryptococcus*, que parecen ser necesarias para la correcta inducción del crecimiento capsular, lo que nos abre nuevas líneas para investigar los posibles mecanismos que correlacionen defectos en la virulencia con la incapacidad para incrementar el tamaño de la cápsula.

Por otro lado, encontramos mutantes que presentaron defectos para incrementar el tamaño de la cápsula *in vitro* y sin embargo, no presentaron diferencias en la virulencia en nuestro modelo respecto a la cepa silvestre. De estos mutantes, únicamente el mutante *app1* (CNAG_06574) había sido previamente caracterizado (Luberto *et al.*, 2003). App1 es una proteína que protege a *Cryptococcus* de la fagocitosis. El mutante correspondiente no presenta defectos de crecimiento ni en la producción de melanina, lo que concuerda con nuestros resultados. La virulencia del mutante de *app1* sólo ha sido caracterizada en modelos murinos deficientes para la proteína C5 del complemento, o bien deficientes en células T y células NK (Luberto *et al.*, 2003). En estos modelos, *app1* es menos virulento que la cepa silvestre. En nuestros ensayos, este mutante no fue capaz de inducir el crecimiento de la cápsula al mismo nivel que la cepa silvestre. Sin embargo, no encontramos defectos de virulencia en el modelo de *G. mellonella*. Nuestros resultados no están necesariamente en contra de lo publicado en modelos murinos, ya que en dichos trabajos no se ha evaluado la virulencia de *app1* en ratones inmunocompetentes. Por otro lado, la función del gen *CAP5* (CNAG_01283) no ha sido caracterizada, pero la secuencia de este gen ha sido depositada en Genbank por el grupo del Dr. Janbon, dónde se encuentra anotada como un gen relacionado con la cápsula (resultados sin publicar). Además, otros cuatro mutantes presentaron defectos en la inducción de la cápsula y no en la virulencia en *G. mellonella* (CNAG_03195, CNAG_05786, CNAG_05528 y CNAG_02877). Este último, CNAG_02877 presenta un motivo rico en cisteínas involucrado en la unión a ADN. Respecto al resto, al no saber la función de estos genes únicos de *Cryptococcus*, ni presentar homología con dominios conocidos en las bases de datos, se precisan más estudios para conocer su implicación en la inducción de la cápsula y/o en la virulencia de *Cryptococcus*.

Finalmente, encontramos mutantes que pese a inducir el tamaño de la cápsula *in vitro*, crecer a 37°C y producir melanina de manera similar a como lo hace la cepa silvestre, fueron menos virulentos en el modelo de *G. mellonella*, (CNAG_04681, CNAG_04661, CNAG_00701, CNAG_00998 y CNAG_00151), lo que indica que dichas mutaciones pueden estar involucradas en otros determinantes de virulencia no analizamos en este trabajo y que deberán ser evaluados en un futuro. Curiosamente, CNAG_00151 y CNAG_02797 ya habían sido identificados. CNAG_00151 ha sido anotada en la base de datos de *C. neoformans* en el Broad Institute como un péptido de

unión a proteínas. Presenta un dominio FF que une a repeticiones en C-terminal hiperfosforiladas de la RNA polimerasa II (Bedford y Leder, 1999; Carty *et al.*, 2000). Por otro lado, CNAG_02797 ha sido nombrado como *CPL1* y se ha asociado a la cápsula. Además, presenta péptido señal de secreción y en nuestro modelo, resultó ser avirulento, al igual que el modelo de ratón en (Liu *et al.*, 2008).

Pese a que hace más de 10 años que los primeros genes involucrados en la síntesis de la cápsula fueron descritos (Chang y Kwon-Chung, 1994; Chang y Kwon-Chung, 1998; Chang y Kwon-Chung, 1999; Chang *et al.*, 1996), aún se desconoce la función bioquímica de las proteínas codificadas. Por ello, es necesario desarrollar nuevas líneas, no sólo para identificar genes involucrados en la síntesis de la cápsula, sino también para la caracterizar los genes *CAP*. El incremento de la cápsula durante la infección es un determinante de virulencia, ya que protege a *Cryptococcus* de los ataques del sistema inmune (revisado en (Zaragoza *et al.*, 2009)). Por todo ello, creemos que este tipo de abordajes, basados en técnicas bioinformáticas que nos permiten hacer comparaciones genómicas son de gran interés, ya que han permitido abrir nuevas líneas de investigación sobre los mecanismos involucrados en la morfogénesis y virulencia de *Cryptococcus*.

2.2.- Relación del ciclo celular y el crecimiento de la cápsula

Una de las partes más extensas de este trabajo se ha centrado en validar una hipótesis que plantea que el crecimiento de la cápsula en *C. neoformans* está coordinado con la progresión del ciclo celular, de tal modo que el crecimiento de la cápsula ocurre durante la fase G1. Nuestra hipótesis se basa en distintas evidencias. Existen varias condiciones que inducen el crecimiento capsular *in vitro* (Granger *et al.*, 1985; Guimaraes *et al.*, 2010; Vartivarian *et al.*, 1993; Zaragoza y Casadevall, 2004; Zaragoza *et al.*, 2003a) y en todas ellas, *C. neoformans* crece más lento, lo que sugiere que una elongación de alguna de las fases del ciclo celular resulta en una inducción del crecimiento capsular. En particular, planteamos que el crecimiento ocurre durante la fase G1 del ciclo por dos razones: La adición de polisacárido durante las fases S/G2/M (que en levaduras suceden casi de manera simultánea a la formación de la gema) dificultaría la gemación y la separación de la célula hija, por lo que parece poco probable que el crecimiento de la cápsula ocurra en esas fases del ciclo. Por otro lado, en condiciones de inducción de la cápsula existe una correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular (Zaragoza *et al.*, 2003a; Zaragoza *et al.*, 2006), lo que sugiere que los mecanismos que regulan el tamaño de la célula (los cuales tienen lugar principalmente en la fase G1), también regulan el crecimiento capsular.

Usando distintas técnicas (citometría de flujo y microscopía en tiempo real), confirmamos la relación entre el crecimiento de la cápsula y la parada en fase G1. Tras alcanzar un tamaño determinado de cápsula, el ciclo celular progresa con normalidad. Los videos además demuestran que tras la primera gemación, la célula madre presenta una fase G1 muy corta, y dicha célula no

aumenta más el tamaño de la cápsula. Estos resultados sugieren que el punto de control G1/S está determinado no solo por el tamaño del cuerpo celular, sino también por el tamaño de la cápsula. En otras levaduras, como *S. cerevisiae*, el principal factor que regula la transición G1/S es el tamaño de la célula, y esta regulación depende de la ruta TOR (Zinzalla *et al.*, 2007). En nuestras condiciones, la inhibición de dicha ruta con rapamicina (y consecuente parada de las células en G1), potencia el crecimiento de la cápsula. En las levaduras que se dividen por gemación, la ruta TOR detecta las condiciones nutricionales del medio y promueve el crecimiento celular y la proliferación, lo que está conectado a su vez con el tamaño celular (Jorgensen *et al.*, 2002). De acuerdo con estos resultados, el benomilo (que inhibe la polimerización de microtúbulos y que detiene las células en la fase M (Hoyt *et al.*, 1991)), inhibe el crecimiento capsular. Nuestros resultados muestran una relación entre el crecimiento de la cápsula y el ciclo celular, lo que supone una nueva perspectiva en la investigación de la regulación del tamaño de la cápsula.

En paralelo, investigamos el fenotipo capsular de un mutante carente de una ciclina que regula la transición G1/S (Cln1). Cuando comenzamos este trabajo, esta proteína estaba anotada como una ciclina, pero no había ninguna evidencia fenotípica de su función. Nuestros resultados muestran que este mutante presenta fenotipos esperados en mutantes de ciclinas de fase G1/S, como son una fase G1 más larga y un cuello de gemación engrosado. Este hecho puede explicar el retraso que se observa en la gemación de este mutante *cln1*, ya que un cuello aberrante podría suponer una dificultad añadida al proceso de gemación dificultando el paso del citoplasma, proteínas y material de pared celular (Virtudazo *et al.*, 2010). En las levaduras que se replican por gemación, la fase G1 de las células que ya han sufrido una gemación suele ser muy corta, ya que ya han alcanzado el tamaño necesario para poder gemar. Por ello, la duración de la fase G1 se mide en las células hijas recién separadas de la célula madre. De esta manera, observamos que las células del mutante *cln1* exhibieron una fase G1 más larga, ya que necesitan más tiempo para alcanzar el tamaño correcto y así activar la señal de inicio de ciclo (START) (Hartwell y Unger, 1977; Johnston *et al.*, 1977; Moore, 1984). Más aún, observamos un retraso en la gemación de *cln1* cuando lo comparamos con las cepas silvestre y reconstituida, lo que concuerda con anteriores estudios (Lew y Reed, 1995; Moore, 1984).

En paralelo a nuestros estudios, otro grupo demostró que dicho gen codifica una ciclina que regula la transición G1/S (Virtudazo *et al.*, 2010). El mutante *cln1* presenta un tamaño de cápsula mayor que el de las cepas silvestres y reconstituidas, tanto en condiciones basales como en los medios que inducen el crecimiento capsular. Este resultado apoya la idea de que una elongación de la fase G1 del ciclo celular potencia el crecimiento de la cápsula. Sin embargo, la estructura de la cápsula no se ve alterada, lo que sugiere que las diferencias estructurales están basadas en la síntesis y acoplamiento del polisacárido en el aparato de Golgi y no en su liberación y ensamblaje en el exterior.

Además, el análisis de proteínas expresadas en condiciones de inducción de la cápsula validó la idea de que Cln1 podía estar involucrada en la transición de G1/S, ya que algunas proteínas relacionadas con la meiosis o la gemación, se encontraban en menor cantidad que en la cepa silvestre. Además, observamos que en *cln1* se encontraban más expresadas proteínas relacionadas con el ciclo del glioxilato y metabolismo de la glucosa, lo que sugiere que el mutante *cln1* tiene un metabolismo más activo que la cepa silvestre. Este resultado concuerda con que la fase del ciclo mas activa metabólicamente es G1. Así pues, nuestros resultados apoyan un modelo en el que factores que alargan la fase G1 y permiten a las células permanecer en la fase del ciclo metabólicamente más activa resultan en un mayor crecimiento de la cápsula. Aunque no sabemos cual es la relación entre ciclo celular y crecimiento capsular, pensamos que situaciones que permiten alargar la fase G1 posiblemente resulten en mayor cantidad de sustratos necesarios para la síntesis de la cápsula, como son el UDP-glucosa, UDP-xilosa y UDP-galactosa.

Sin embargo, nuestros resultados deben ser analizados con cautela, ya que no todas las condiciones que causan un crecimiento más lento de la levadura resultan necesariamente en un incremento en el tamaño capsular. La inducción de la cápsula depende es un estímulo exterior (manitol, suero, CO₂ o una limitación de nutrientes) (Granger *et al.*, 1985; Guimaraes *et al.*, 2010; Vartivarian *et al.*, 1993; Zaragoza *et al.*, 2003a), sin el cual posiblemente no se induce el crecimiento capsular. Se sabe poco sobre los mecanismos moleculares involucrados en la percepción y transducción del crecimiento capsular y se necesitan más estudios para entender los cambios que sufre la célula durante el crecimiento de la cápsula. En este sentido, se sabe que la ruta del AMPc/PKA es necesaria para la síntesis de la cápsula. Se ha demostrado que una sobre-expresión de PKA produce la formación de células más grandes, con cápsulas más grandes (Choi *et al.*, 2012; Zaragoza *et al.*, 2003a). Además en muchas otras especies de hongos, algunos de los cambios morfológicos que sufren en respuesta al ambiente son detectados en parte por la ruta AMPc/PKA (Gimeno *et al.*, 1992; Gold *et al.*, 1994). Curiosamente, la ruta AMPc/PKA está también involucrada en la regulación del ciclo celular de otros organismos (Mitsuzawa, 1994). Por ello, pensamos que en *C. neoformans*, la actividad de PKA está coordinada con el ciclo celular (Tokiwa *et al.*, 1994). De tal forma que durante la fase G1 alcanza unos niveles determinados para permitir el correcto paso por esta fase, y su progresión a la fase S. Sin embargo, en *cln1* existe un bloqueo parcial entre estas dos fases. De modo que es posible que el retraso observado en la transición G1/S en *cln1* provoque la sobre-expresión de PKA, dando lugar a células de mayor tamaño, con cápsulas de mayor tamaño.

El mutante *cln1* mostró defectos de crecimiento a 37°C que fueron compensados por la adición de estabilizadores osmóticos, lo cual puede deberse a que algunos genes necesarios para crecer a dicha temperatura estén regulados por Cln1 (Igual *et al.*, 1996). En este sentido, *cln1* es más sensible a factores que alteran la estructura de la pared celular, como el rojo congo. También observamos una mayor unión de WGA. La unión de esta lectina pone de manifiesto la existencia de

numerosos puntos donde las reorganizaciones de quitina de la pared han tenido lugar tras la gemación, dejando expuestos los oligómeros de quitina a través de la cápsula (Rodrigues *et al.*, 2008a). Además, se sabe que la sobre-expresión de PKA puede afectar al transporte de componentes de la célula, como pueden ser componentes de la pared celular. Por ello, pensamos que el bloqueo parcial en G1/S de *cln1* podría ocasionar una mayor acumulación de PKA, y con ello, el transporte de compuestos de la pared celular podría resultar alterado. De ahí que *cln1* necesite estabilizadores osmóticos como sorbitol para crecer a 37°C, y presenta una mayor sensibilidad al rojo congo.

El ciclo celular y las ciclinas G1/S están también involucradas en la morfogénesis y diferenciación de diferentes levaduras como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis* (Castillo-Lluva y Perez-Martin, 2005; Chapa y Lazo *et al.*, 2005; Loeb *et al.*, 1999). Nuestros resultados concuerdan con estos otros estudios, ya que el incremento de la cápsula se puede considerar como un proceso de diferenciación que implica múltiples cambios a nivel celular (Haynes *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; Maxson *et al.*, 2007a; Maxson *et al.*, 2007b; Zaragoza, 2011). Las ciclinas constituyen una familia de proteínas conservadas que regulan la progresión del ciclo celular mediante la activación de distintos complejos protein-quinasa ciclina-dependientes denominados CDK. Existen distintas ciclinas que controlan la transición a lo largo del ciclo celular mediante la unión a las CDK correspondientes (Choi y Goodwin, 2011). Sin embargo, estas ciclinas pueden estar involucradas a su vez en distintas rutas de señalización y en virulencia (Castillo-Lluva y Perez-Martin, 2005; Shim y Woloshuk, 2001). Es posible que Cln1, esté regulando el crecimiento en medio rico y por ello que su delección provoque defectos en el crecimiento en Sabouraud a 37°C y que éstos sean compensados por la adición de sulfato de amonio, ya que parece que la regulación del crecimiento en medio mínimo no depende de Cln1.

Curiosamente, las células recuperadas de las larvas incubadas a 37°C presentan un tamaño de cápsula superior al de las células crecidas *in vitro*, y a su vez, el incremento en el tamaño de la cápsula experimentado por el mutante *cln1* fue superior que el experimentado por la cepa silvestre y la cepa reconstituida. Este resultado se correlaciona con el hecho de que las células de *Cryptococcus* pueden permanecer en el huésped sin ser eliminadas en un estado latente (ver revisión en (Dromer *et al.*, 2011)).

En resumen, nuestros resultados demuestran que el crecimiento capsular en *C. neoformans* está coordinado con el ciclo celular. Este hallazgo abre nuevas líneas de investigación centradas en la importancia del ciclo celular en la patogénesis de los hongos patógenos y la expresión de factores de virulencia. Nuestro trabajo también sugiere que la transición de las fase G1 a S en *C. neoformans* está regulado por el tamaño de la cápsula, lo que abre nuevas perspectivas sobre la regulación del ciclo celular.

Además de la influencia sobre la cápsula, también hemos demostrado que otros factores de virulencia, como es la acumulación de melanina y expresión de la enzima lacasa, están regulados

por elementos involucrados en el ciclo celular. Este resultado fue confirmado de manera independiente utilizando varios abordajes como la hipersensibilidad del mutante *cln1* a factores de estrés y el efecto de inhibidores del ciclo celular sobre la melanización. El análisis filogenético reveló que Cln1 de *C. neoformans* ha evolucionado de manera diferente a otras ciclinas de otros organismos y que este patrón de evolución se encuentra sólo en los hongos basidiomicetos. Este resultado sugiere que Cln1 de *C. neoformans* ha adquirido funciones específicas que no están presentes en otros organismos y por ello, podría regular funciones, como la producción de melanina, características de *Cryptococcus*.

La producción de melanina es considerada como un factor de virulencia (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Rhodes *et al.*, 1982; Williamson, 1994). La lacasa es una proteína que se localiza en la pared celular de *C. neoformans* (Zhu *et al.*, 2001). *Cryptococcus neoformans* tiene dos lacasas, Lac1 y Lac2, aunque no juegan el mismo papel en la melanización, ya que la delección de *LAC2* no resulta en un defecto en la virulencia (Pukkila-Worley *et al.*, 2005; Zhu y Williamson, 2004). La melanización ocurre durante la infección en mamíferos y es necesaria para la supervivencia de la levadura en el huésped. Por el momento, se desconoce si existen sustratos para la lacasa de *C. neoformans* en *G. mellonella*, aunque se sabe que existen múltiples sustratos para la enzima lacasa y que su polimerización es muy diferente (Garcia-Rivera *et al.*, 2005). La no diferencia de virulencia entre células previamente melanizadas y no melanizadas durante la infección de *G. mellonella* podría deberse a que en *G. mellonella*, *C. neoformans* encuentra sustratos disponibles para la lacasa y por ello, puede melanizar y presentar una virulencia similar a la encontrada en células previamente melanizadas. O por el contrario, que en *G. mellonella*, *C. neoformans* no pueda melanizar, de modo que al dividirse y dar lugar a una nueva progenie de células, éstas no melanicen, y por tanto, no haya diferencias entre infectar a las larvas con células previamente melanizadas o no melanizadas.

Se han identificado rutas de señalización que regulan la producción de melanina (Choi *et al.*, 2012; Pukkila-Worley *et al.*, 2005). Entre ellas está la ruta dependiente de AMPc y de la activación de la PKA (Alspaugh *et al.*, 2000; Alspaugh *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2001). Además el hecho de que se haya relacionado esta ruta con la melanización (D'Souza *et al.* 2001), apoya nuestra hipótesis de que en *cln1* la ruta AMPc/PKA este sobreexpresada, y que el correcto balance de la actividad de PKA es necesario para la correcta melanización de *C. neoformans*, ya que existen evidencias de que una sobreexpresión de PKA influyen en la actividad lacasa (Choi *et al.*, 2012; D'Souza *et al.*, 2001; Pukkila-Worley *et al.*, 2005).

En resumen, nuestros resultados han demostrado una compleja relación entre la expresión de factores de virulencia en *Cryptococcus* y el ciclo celular, lo cual explica los defectos en virulencia del mutante *cln1* utilizado en este trabajo. Por ello, pensamos que estos resultados ofrecen una nueva perspectiva en el estudio de la virulencia de *C. neoformans* y la posibilidad de nuevas dianas para drogas involucradas en la progresión del ciclo celular.

Sección II: Formación de células gigantes

La formación de células gigantes supone otro de los cambios morfológicos característicos de *Cryptococcus* durante la infección. Estas células han sido descritas en la literatura como aberraciones o anomalías en preparaciones histológicas (Cruickshank *et al.*, 1973; D'Souza *et al.*, 2001; Love *et al.*, 1985), pero su importancia en la patogénesis de *C. neoformans* era desconocida. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que dichas células son una transición característica de *Cryptococcus* en el huésped (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Por ello, uno de nuestros principales objetivos ha estado centrado en su caracterización y estudio de su importancia durante la infección.

En este trabajo hemos realizado una caracterización fenotípica de las células gigantes. Mediante diversos abordajes hemos demostrado que la cápsula de estas células es diferente a la de las células crecidas *in vitro*, ya que presentan una mayor densidad de polisacárido y diferencias antigénicas. Estos cambios pueden tener consecuencias en la interacción con el huésped (Zaragoza *et al.*, 2010). Los cambios estructurales y antigénicos constituyen un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Mansour y Levitz, 2002; Roeder *et al.*, 2004). El aumento de la densidad afecta a la permeabilidad de moléculas, como son las proteínas del complemento, lo que hace que se localicen en una región en la cápsula alejada de la pared celular (Zaragoza *et al.*, 2003b). Por ello, pensamos que la formación de células gigantes es una estrategia que le permite a *Cryptococcus* evadir la respuesta inmune y por lo tanto perdurar en el huésped durante largos periodos de tiempo. La latencia constituye un rasgo importante en la virulencia de *Cryptococcus* (ver revisión en (Dromer *et al.*, 2011)). Se ha propuesto que el lugar más probable para permanecer en el huésped es en el interior de los macrófagos (Goldman *et al.*, 1994). Sin embargo, la formación de células gigantes ofrece una alternativa para permanecer en el huésped durante largos periodos de tiempo sin ser eliminado por el sistema inmune.

Además, también observamos que otras estructuras relacionadas con la cápsula, como son polímeros de N-acetil-glucosamina se encuentran expresados en mayor proporción en estas células. Este fenotipo podría deberse a la hidrólisis de oligómeros de quitina durante la reorganización de la pared celular, la cual es imprescindible durante la gemación, y que debido al tamaño de estas células, este proceso pueda ser más marcado (Rodrigues *et al.*, 2008a). Una de las características más llamativas de estas células es el diámetro de la pared celular. Mientras que en células normales la pared celular tiene un diámetro de 100-200 nm, en las células gigantes puede alcanzar 2-3 μm (Zaragoza *et al.*, 2010). La pared celular es una estructura importante para la viabilidad de las células, ya que confiere estabilidad osmótica y estructural a las células (ver revisión (Doering, 2009)). Además, se sabe que sus componentes son capaces de inducir un patrón similar de citoquinas en macrófagos humanos de sangre periférica (Walenkamp *et al.*,

1999). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si el engrosamiento de la pared celular en las células gigantes se debe a alguno de sus componentes en particular o al conjunto de todos y las implicaciones exactas que tiene para la supervivencia de estas células en el huésped. También se observaron diferencias en la presencia de vacuolas intracelulares entre las células gigantes y las células de tamaño regular, lo que es consistente con diferencias en el metabolismo de estas células y con un posible mayor transporte de componentes de la pared celular y de la cápsula (Nosanchuk *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009).

La formación de células gigantes debe aportar a *Cryptococcus* alguna ventaja durante la infección. Esta idea, junto con el hallazgo por primera vez de células gigantes en un modelo invertebrado, como es el de *G. mellonella*, nos lleva a pensar que la capacidad para formar células gigantes constituya un factor en sí de virulencia, adquirido a través del encuentro con huéspedes ambientales y seleccionado a lo largo de la evolución. Además, en este modelo demostramos que las células gigantes pueden causar la muerte de las larvas, lo cual se asoció a la aparición de células de tamaño regular durante la infección. Por ello, nuestros resultados indican que estas células, además de evadir la respuesta inmune y contribuir a la supervivencia del hongo en el huésped, también contribuyen a causar infección diseminada mediante la producción de un gran número de células hijas de tamaño regular.

El control de la infección por *Cryptococcus* está mediado por células T CD4+ (ver revisión (Brummer, 1998)). En condiciones normales, estas células se encargan de activar a macrófagos y otras células del sistema inmune para eliminar a *Cryptococcus*. De esta forma, las células gigantes permanecerían en el huésped durante largos periodos de tiempo (formas latentes) y las células pequeñas serían eliminadas. Sin embargo, los pacientes VIH presentan un recuento de células T CD4+ muy bajo, por lo que la infección por *C. neoformans* progresa rápidamente (Liao *et al.*, 2012). En este caso, los pacientes sufren una neumonía y diseminación a otros órganos, principalmente al sistema nervioso central (Charlier *et al.*, 2009). De acuerdo a nuestros resultados, pensamos que las células gigantes podrían dar lugar a nuevas células de tamaño regular que no podrían ser controladas por la escasez de células T CD4+ y con ello, permitir la progresión de la infección. Además, se sabe que las células gigantes no sólo evitan la fagocitosis de los macrófagos de ellas mismas, sino de células de *Cryptococcus* de tamaño regular (Crabtree *et al.*, 2012; Okagaki y Nielsen, 2012), lo que tiene implicaciones importantes durante el desarrollo de la enfermedad.

Uno de los hallazgos más relevantes y que podría tener consecuencias clínicas de este trabajo es la diferencia que exhiben *C. neoformans* y *C. gattii* en su capacidad de formar células gigantes. Para investigar la morfogénesis de *C. neoformans* y *C. gattii*, utilizamos tanto un modelo invertebrado (*G. mellonella*) como modelos de ratón. En ambos modelos, *C. neoformans* forma células gigantes por un crecimiento tanto del cuerpo celular como de la cápsula. En el caso de *C. gattii* la formación de células gigantes fue diferente a la de *C. neoformans*, y además, también observamos diferencias en como se formaban en las larvas de *G. mellonella* y en los ratones. La

principal diferencia con respecto a *C. neoformans* es que *C. gattii* indujo células gigantes principalmente por crecimiento de la cápsula y no del cuerpo celular, aunque en *G. mellonella* observamos que también se produjo un crecimiento moderado del cuerpo celular. La diferencia observada entre los huéspedes puede ser debida a la diferente inmunidad a la que se encuentra el patógeno, de manera que en huéspedes más sencillos, con un sistema inmune mucho más básico, *C. gattii* sigue una estrategia parecida a la desarrollada por *C. neoformans*. Además, la cantidad de células gigantes recuperadas al infectar con *C. neoformans* o *C. gattii* fue muy distinta, lo cual también puede explicar la diferente patogénesis de estos dos microorganismos. En ambos modelos, fuimos capaces de recuperar alrededor de un 40% de células gigantes de *C. gattii*, mientras que este fenómeno fue mucho más raro en el caso de *C. neoformans*. Las células gigantes de *C. neoformans* son poliploides (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010), lo que sucede como resultado de procesos de endoreduplicación. Por el momento, se desconoce si es así también para *C. gattii*. Nuestros resultados indican que la formación de células gigantes es una característica diferencial entre *C. neoformans* y *C. gattii*, y que esta propiedad está más acentuada en *C. gattii*.

La razón por la que *C. neoformans* y *C. gattii* afectan de manera diferente no es conocida. Se ha postulado que *C. gattii* es capaz de replicarse en el interior de los macrófagos más eficientemente que *C. neoformans* y que además presentan mayor actividad mitocondrial (Byrnes *et al.*, 2010), lo que le supondría una ventaja a la hora de producir infección en el huésped. Nuestros resultados aportan nuevas evidencias a la diferente epidemiología causada por estos microorganismos. *Cryptococcus gattii* forma células gigantes más eficientemente que *C. neoformans*. Este hecho repercute directamente en la virulencia de este microorganismo, ya que al sistema inmune le es más complicado eliminar a *C. gattii* que a *C. neoformans*, lo que aumenta las posibilidades de producir enfermedad incluso en personas con el sistema inmune intacto. Alternativamente, es posible también que la mayor cantidad de polisacárido presente en las células gigantes pueda convertirse en polisacárido extracelular y producir daños en el sistema inmune derivados de la inmunomodulación que ejerce el GXM (Monari *et al.*, 2006; Vecchiarelli, 2000b), y de ahí que *C. gattii* pueda infectar a individuos inmunocompetentes. Además, el hecho de que *C. gattii* forme mayor cantidad de células gigantes sugiere que esta levadura tiene menor diseminación a otros órganos comparado con *C. neoformans* lo cual también se correlaciona con que *C. gattii* cause principalmente neumonía y no meningoencefalitis (Harris *et al.*, 2011; Ngamskulrungroj *et al.*, 2012).

Por todo ello, la interacción de las células gigantes con el sistema inmune y su función durante la infección son algunas de las áreas prioritarias en la investigación en *Cryptococcus*. En este trabajo hemos demostrado también que estas células inducen respuesta inmune en los macrófagos de forma similar a como lo hacen células normales de *Cryptococcus*, lo que significa que pese a no ser fagocitadas sí son capaces de causar inmunomodulación. En todos los casos observamos una

producción de citoquinas pro-inflamatorias principalmente IL-6 y TNF- α . Este patrón puede contribuir a causar infección aguda y daño pulmonar (Li y Mitchell, 1997; Lortholary *et al.*, 1999; Retini *et al.*, 1996). El patrón de citoquinas es sin duda un elemento clave para el desarrollo de la infección (Jain *et al.*, 2009; Voelz *et al.*, 2009), ya que de él depende que se produzca una respuesta protectora Th1 frente a la infección o una respuesta no protectora Th2 (Almeida *et al.*, 2001; Huffnagle, 1996). En este sentido, sea descrito que la inducción de respuesta Th2 favorece el parasitismo intracelular de *Cryptococcus* (Voelz *et al.*, 2009). Curiosamente, también observamos una mayor producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 por parte de los macrófagos infectados con las células gigantes comparado con la cuantificada tras la infección con células de tamaño regular tanto de *C. neoformans* como de *C. gattii*. IL-10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias y por ello la mayor producción de esta citoquina por parte de las células gigantes podría proporcionar una estrategia para la permanencia de *Cryptococcus* en el huésped (de Waal Malefyt *et al.*, 1991; de Waal Malefyt *et al.*, 1992).

En nuestro trabajo no encontramos que las células gigantes de *C. neoformans* y *C. gattii* produzca efectos diferentes sobre la producción de citoquinas por macrófagos. Esto contrasta con resultados de la literatura (Cheng *et al.*, 2009; Schoffelen *et al.*, 2013). Aunque es posible que estas células sean reconocidas de manera diferente por el huésped existen varios aspectos técnicos que pueden influir en este resultado. En primer lugar, nuestros experimentos están realizados en presencia de un anticuerpo monoclonal que opsoniza las células, con lo que los cambios observados pueden ser debidos a interacciones del anticuerpo con los receptores Fc y no tanto a unión de las células a receptores que reconocen el polisacárido capsular. Además, para la separación de células gigantes de células de tamaño regular se utilizaron filtros de 20 micras. Estos filtros retienen de manera eficiente las células gigantes de *C. neoformans*. Sin embargo, en el caso de *C. gattii*, es posible que células gigantes formadas por aumento de la cápsula y no del cuerpo celular no queden retenidas en el filtro, con lo que la población retenida en el filtro quizás no sea representativa de las células gigantes de *C. gattii*. Pese a estas dificultades técnicas, pensamos que el hecho de que los macrófagos sean capaces de reconocer e iniciar una respuesta, pese a no poder fagocitar a estas células supone un avance para entender la patogénesis de *Cryptococcus* y la importancia de la morfogénesis durante la infección.

Por todo ello, se puede concluir que la inducción de cambios morfológicos de *C. neoformans* durante la infección permite la evasión del sistema inmune a diferentes niveles y contribuyen a la supervivencia del patógeno en el huésped. Pese a que los mecanismos moleculares involucrados tanto en el proceso de crecimiento de la cápsula como en la formación de células gigantes no son conocidos, nuestro trabajo ha contribuido a dilucidar algunos de estos mecanismos, ya que hemos encontrado nuevos genes que regulan este proceso y hemos determinado la relación entre ciclo celular y crecimiento capsular. Además, hemos demostrado que las células gigantes participan en la infección causada por *Cryptococcus*, y que este aspecto puede ser determinante para la

diferente epidemiología causada por *C. neoformans* y *C. gattii*. Por ello, pensamos que este trabajo es el origen de futuras líneas de investigación que ahondarán en los mecanismos de virulencia de *Cryptococcus*. Finalmente, pensamos también que este trabajo podrá contribuir a diseñar estrategias para diagnosticar estadios tempranos de la infección mediante la detección de marcadores expresados por las células gigantes, así como a la identificación de nuevas dianas para el tratamiento de la criptococosis.

Conclusiones

1.- *Cryptococcus* es capaz de formar células gigantes y de aumentar el tamaño capsular durante la infección en *Galleria mellonella* de manera similar a como lo hace en mamíferos. Por ello, el huésped no vertebrado *Galleria mellonella* es un sistema alternativo para el estudio de la morfogénesis de *Cryptococcus* durante la infección.

2.- La identificación de los mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento de la cápsula puede realizarse mediante abordajes genómicos basados en la comparación de proteomas. Esta estrategia nos ha permitido seleccionar posibles genes candidatos involucrados en el crecimiento capsular. Además, se han identificado nuevos genes necesarios para la virulencia de *Cryptococcus*.

3.- El crecimiento de la cápsula de *Cryptococcus neoformans* ocurre principalmente durante la fase G1 y está regulado por factores que regulan el ciclo celular, como Cln1. Además, Cln1, también influye en la expresión de otros factores de virulencia, como es la acumulación de melanina.

4.- *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* producen células gigantes, aunque *C. gattii* lo hace de manera más frecuente. Las células gigantes contribuyen al desarrollo de la enfermedad causada por *Cryptococcus* ya que son capaces de producir infección en *G. mellonella*. Además, las células gigantes son capaces de inducir inmunomodulación.

Anexos

Anexo 1

Listado de proteomas utilizados para la identificación de genes involucrados en la síntesis y crecimiento de la cápsula.

# Taxón	Especie	Proteoma	Fuente
3702	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARATH.1	integr8
4754	<i>Pneumocystis carinii</i>	PNECA.1	Fungal_Genomes
4837	<i>Phycomyces blakesleeana</i>	PHYBL.1	JGI
4897	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	SCHJP.1	Broad_Institute
4914	<i>Kluyveromyces waltii</i>	KLUWA.1	YGOB
4924	<i>Pichia stipitis</i>	PICST.1	JGI
4929	<i>Pichia guilliermondii</i>	PICGU.1	Broad_Institute
4931	<i>Saccharomyces bayanus</i>	SACBA.1	YGOB
4932	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YEAST.2	SGD
4934	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	SACKL.1	Fungal_Genomes
4952	<i>Yarrowia lipolytica</i>	YARLI.1	integr8
4959	<i>Debaryomyces hansenii</i>	DEBHA.1	integr8
5037	<i>Ajellomyces capsulata</i>	AJECA.1	Broad_Institute
5057	<i>Aspergillus clavatus</i>	ASPCL.1	TIGR
5059	<i>Aspergillus flavus</i>	ASPFL.1	Broad_Institute
5061	<i>Aspergillus niger</i>	ASPNG.1	Broad_Institute
5062	<i>Aspergillus oryzae</i>	ASPOR.1	Integr8
5141	<i>Neurospora crassa</i>	NEUCR.1	other
5145	<i>Podospira anserina</i>	PODAN.1	Fungal_Genomes
5180	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SCLSC.1	Broad_Institute
5207	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CRYNE.1	integr8
5270	<i>Ustilago maydis</i>	USTMA.1	Broad_Institute
5297	<i>Puccinia graminis</i>	PUCGR.1	Broad_Institute
5306	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PHACH.1	JGI
5346	<i>Coprinopsis cinerea</i>	COPCI.1	Broad_Institute
5476	<i>Candida albicans</i>	CANAL.2	Candida_Genome_Datab
5478	<i>Candida glabrata</i>	CANGA.2	Genolevures
5482	<i>Candida tropicalis</i>	CANTR.1	Broad_Institute
5501	<i>Coccidioides immitis</i>	COCIM.1	Broad_Institute
5507	<i>Fusarium oxysporum</i>	FUSOX.1	Broad_Institute
5518	<i>Gibberella zeae</i>	GIBZE.1	integr8
6035	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	ENCCU.1	integr8

9606	<i>Homo sapiens</i>	HUMAN.1	ensembl
27288	<i>Saccharomyces castellii</i>	SACCA.1	SGD
27291	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	SACPA.1	Fungal_Genomes
28985	<i>Kluyveromyces lactis</i>	KLULA.2	NCBI
29883	<i>Laccaria bicolor</i>	LACBI.1	JGI
33178	<i>Aspergillus terreus</i>	ASPT.1	Broad_Institute
36911	<i>Clavispora lusitaniae</i>	CLALS.1	Broad_Institute
36914	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	LODEL.1	Broad_Institute
38033	<i>Chaetomium globosum</i>	CHAGB.1	Broad_Institute
40559	<i>Botrytis fuckeliana</i>	BOTFU.1	Broad_Institute
42374	<i>Candida dubliniensis</i>	CANDU.1	Fungal_Genomes
51453	<i>Trichoderma reesei</i>	TRIRE.1	JGI
64495	<i>Rhizopus oryzae</i>	RHIOR.1	Broad_Institute
109871	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	BATDE.1	Broad_Institute
114524	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	SACKU.1	Fungal_Genomes
114525	<i>Saccharomyces mikatae</i>	SACMI.1	Fungal_Genomes
117187	<i>Gibberella moniliformis</i>	GIBMO.1	Broad_Institute
140110	<i>Nectria haematococca</i>	NECHA.1	JGI
148305	<i>Magnaporthe grisea</i>	MAGGR.1	Broad_Institute
162425	<i>Emericella nidulans</i>	EMENI.1	NCBI
284811	<i>Ashbya gossypii</i>	ASHGO.2	NCBI
284812	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SCHPO.1	integr8
321614	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	PHANO.1	Broad_Institute
330879	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ASPFU.1	Broad_Institute
331117	<i>Neosartorya fischeri</i>	NEOFI.1	TIGR
336963	<i>Uncinocarpus reesii</i>	UNCRE.1	Broad_Institute
365493	<i>Sporobolomyces roseus</i>	365493.1	JGI
383855	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	383855.1	JGI
436907	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	VANPO.1	YGOB
561896	<i>Postia placenta</i>	POSPM.1	JGI

Anexo 2

Videos suplementarios de esta tesis.

Video suplementario 1: Visualización en tiempo real del crecimiento de la cápsula de *C. neoformans* en medio de inducción de la cápsula (10% Sabouraud en MOPS, pH 7,3) a 37°C. Las fotos se tomaron cada 5 minutos tal y como se detalla en material y métodos. El video se generó juntando 5 fotos por segundo, de forma que 1 segundo del video equivale a 25 minutos de tiempo real.

Video suplementario 2: Video representativo de una célula de *C. neoformans* H99 (Wt) en Sabouraud líquido a 30°C donde se puede observar el tiempo de duplicación, así como calcular la longitud de la fase G1. En este caso se tomaron fotos cada 2 min. El intervalo entre la aparición de la primera gema, hasta que esa célula hija vuelve a gemar corresponde a la fase G1, que en este caso tiene una duración de 56 min (28 fotogramas).

Video suplementario 3: Video representativo de una célula de *C. neoformans* *cln1* (mutante de ciclina G1/S) en Sabouraud líquido a 30°C donde se puede observar el tiempo de duplicación, así como calcular la longitud de la fase G1. En este caso se tomaron fotos cada 3 min. El intervalo entre la aparición de la primera gema capaz de soltarse, hasta que esa célula hija vuelve a gemar corresponde a la fase G1, que en este caso tiene una duración de 93 min (31 fotogramas).

Video suplementario 4: Replicación intracelular de *C. neoformans*-GFP en macrófagos de la línea inmortalizada RAW264.7 (ver Material y métodos). Las fotos se tomaron cada 3 min en campo claro y en el filtro verde (570 nm). El video se generó juntando 5 fotos por segundo, de modo que 1 segundo del video equivale a 15 minutos de tiempo real. Los videos suplementarios 3 y 4 se generaron de la misma manera

Video suplementario 5: División y fusión de macrófagos de la línea celular RAW264.7 infectados con *C. neoformans*-GFP.

Video suplementario 6: Extrusión de *C. neoformans*-GFP de macrófagos de la línea celular RAW264.7

Video suplementario 7: Interacción entre células gigantes y macrófagos. Se tomaron fotos cada 3 min y los videos se generaron juntando 5 fotos por segundo (1 segundo del video equivale a 15 minutos de tiempo real).

Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection

Oscar Zaragoza^{1,2*}, Rocío García-Rodas¹, Joshua D. Nosanchuk^{2,3}, Manuel Cuenca-Estrella¹, Juan Luis Rodríguez-Tudela¹, Arturo Casadevall^{2,3}

1 Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, **2** Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, United States of America, **3** Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, United States of America

Abstract

The interaction between fungal pathogens with the host frequently results in morphological changes, such as hyphae formation. The encapsulated pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is not considered a dimorphic fungus, and is predominantly found in host tissues as round yeast cells. However, there is a specific morphological change associated with cryptococcal infection that involves an increase in capsule volume. We now report another morphological change whereby gigantic cells are formed in tissue. The paper reports the phenotypic characterization of giant cells isolated from infected mice and the cellular changes associated with giant cell formation. *C. neoformans* infection in mice resulted in the appearance of giant cells with cell bodies up to 30 µm in diameter and capsules resistant to stripping with γ-radiation and organic solvents. The proportion of giant cells ranged from 10 to 80% of the total lung fungal burden, depending on infection time, individual mice, and correlated with the type of immune response. When placed on agar, giant cells budded to produce small daughter cells that traversed the capsule of the mother cell at the speed of 20–50 m/h. Giant cells with dimensions that approximated those *in vivo* were observed *in vitro* after prolonged culture in minimal media, and were the oldest in the culture, suggesting that giant cell formation is an aging-dependent phenomenon. Giant cells recovered from mice displayed polyploidy, suggesting a mechanism by which gigantism results from cell cycle progression without cell fission. Giant cell formation was dependent on cAMP, but not on Ras1. Real-time imaging showed that giant cells were engaged, but not engulfed by phagocytic cells. We describe a remarkable new strategy for *C. neoformans* to evade the immune response by enlarging cell size, and suggest that gigantism results from replication without fission, a phenomenon that may also occur with other fungal pathogens.

Citation: Zaragoza O, García-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, et al. (2010) Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathog* 6(6): e1000945. doi:10.1371/journal.ppat.1000945

Editor: Aaron P. Mitchell, Carnegie Mellon University, United States of America

Received: December 11, 2009; **Accepted:** May 7, 2010; **Published:** June 17, 2010

Copyright: © 2010 Zaragoza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: O.Z. is supported by grants MPY1025/06, SAF2008-03761 and MPY1142/08 from Ministerio de Ciencia e Innovación and MPY1108/06 from Instituto de Salud Carlos III. A.C. is supported by grants NIH grants AI033774, HL059842, and 5R37AI033142. O.Z. held during part of this work a “Ramón y Cajal” contract. R.G.R. is supported by a FPI fellowship (reference BES-2009-015913). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: ozaragoza@isciii.es

Introduction

The interaction between a microbe and a host involves a complex response by both the pathogen and the infected individual. The host has multiple defence mechanisms to avoid infection, damage and disease. Microbial pathogens adapt to survive in a host through multiple changes that include signalling pathways that confer the capacity to survive immune-mediated stresses. Both entities, the host and the microbe, interact and each contributes to the outcome of infection [1].

In the case of fungal pathogens, the interaction with the host frequently results in morphological changes. For example, *Candida albicans* forms pseudohyphae and true hyphae during infection, phenomena associated with virulence [2,3,4]. Other examples of fungal pathogens that form filaments during infection are *Aspergillus* species and the agents of zygomycosis. In contrast, *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* manifest a temperature regulated dimorphism, such that at ambient temperatures they form filaments and at 37°C transform into yeast cells [5,6,7]. Although the role of these morphological transitions is not completely understood, it is believed that the phenomenon of

fungal dimorphism plays an important function during the interaction of each of these microbes with their host.

The fungus *Cryptococcus neoformans* is the causative agent of cryptococcosis, a disease responsible for over 600,000 deaths per year, which makes this pathogen a major global threat. Cryptococcosis is currently the fourth leading cause of death from infectious diseases in Sub-Saharan Africa [8]. *C. neoformans* is unique among the major fungal pathogens in that it possesses a polysaccharide capsule surrounding a yeast cell body [9]. Capsular polysaccharides are also released into host tissues [10,11,12], where they mediate numerous deleterious effects on host immune function [13,14,15]. In fact, the polysaccharide capsule is the factor that makes the greatest contribution to the virulence of *C. neoformans* [16].

Although *C. neoformans* can form pseudohyphae during mating [9], this pathogen is mainly found in host tissues as round yeast cells. However, there is a specific morphological change associated with cryptococcal infection that involves a significant increase in capsule volume. Capsule size in *C. neoformans* depends on the growth condition (reviewed in [17]). While capsule size is relatively small in standard laboratory media and in the environment, it

Author Summary

In this article we describe the formation of giant cells by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* during infection, involving an approximately 900-fold increase in volume compared to that of yeast cells grown in vitro. This switch to gigantism is a dramatic transition that is posited to have important consequences during infection. The paper reports the phenotypic characterization of these cells and the relationship between giant cell formation and polyploidy which suggests that gigantism is achieved by continued cell growth and DNA replication without fission. During infection, we observed an inverse correlation between the proportion of giant cells in the lung of infected mice and the inflammatory response elicited by the animals. In conclusion, our results indicate that during infection, *C. neoformans* forms giant cells, which might be implicated in fungal survival in the host during long time periods, especially during chronic and asymptomatic infection. The capacity for gigantism is an important new facet in fungal pathogenesis that provides the pathogen with the ability to escape host defences. We propose that the transition to gigantism can have profound consequences for the host-pathogen interaction including promoting fungal persistence in the host that can translate into latency and disease relapses.

undergoes a large increase in capsule size during pulmonary infection [18], such that it can comprise more than 90% of the total volume of the cell [19]. Capsular enlargement is believed to confer an advantage to the microorganism during its interaction with the host. For example, capsule growth interferes with complement-mediated phagocytosis [20] and protects the yeast cell against free radicals and antimicrobial agents [21]. Furthermore, increased capsule size makes the yeast more difficult to phagocytose by a variety of phagocytic cells, including amoebae that can prey upon *C. neoformans* in the environment [21].

We now report another morphological change whereby gigantic fungal cells are formed in tissue. This change is achieved, not only by a significant increase in capsule size, but also by an enlargement of the cell body. During pulmonary infection, we observed that a significant proportion of yeasts in the lung had cell volumes 900-fold larger than cells grown in standard laboratory conditions. In retrospect, giant cells have been noted in prior studies [18,22,23,24,25], but were never isolated or studied. The emergence of fungal giant cells poses a formidable problem for the immune system. In this study we present experimental evidence suggesting that *C. neoformans* gigantism may be a strategy that confers upon the organism the ability to survive within the host for long time periods.

Results

C. neoformans produce gigantic cells during infection

While the typical size of *C. neoformans* cells ranges between 4–8 microns (Figure 1A), we confirm the existence and report the recovery of *C. neoformans* cells of enormous size formed during infection (Figure 1B). Although these cells manifested a large increase in capsule size, there was also a concomitant increase in cell body size. The cell body reached 25–30 μm in diameter, which was almost 7-fold greater than the 4.5 μm average size observed in vitro. This effect was more dramatic if the size of the capsule was included, with the giant cell size typically ranging from 40 to 60 μm in diameter, although extremely large cells with diameters around 70–100 μm were occasionally observed. If one

considers volume applying the formula for a sphere ($V = 4/3 \times \pi \times (r^3)$), then giant cell formation involved an increase of 900-fold in cellular volume, compared to cells grown in Sabouraud medium. We investigated whether the phenomenon was found in different cryptococcal strains. Consequently, we infected different individual mice with ten different *C. neoformans* strains (both serotype A and D, including standard strains, such as H99, 24067 or B3501, and clinical isolates from the Yeast Collection of the Spanish Mycology Reference Laboratory). For all strains, we found giant cells after three weeks of infection, indicating that this phenomenon applied to diverse strains (results not shown). Hence, we focused our efforts on the model serotype A strain H99, and we arbitrarily defined giant cells as those with a cell diameter greater than 30 μm (capsule included), a size that is 5–6 times the usual size observed in vitro, and is virtually never encountered during in vitro experimental conditions. Using this strain, we observed giant cell formation in four different mouse strains (CD1, BALB/c, C57BL/6J and CBA/J), indicating that the emergence of giant cells was also not mouse strain specific.

Morphological features of the giant cells

Giant cells had different cellular features than cells of regular size (Figure 1). Giant cells frequently contained multiple vesicles of unknown function that could reach more than 50 per cell (Figure 1C). In addition, there was usually a single enlarged vesicle that occupied a significant proportion of the cell body volume. To better identify these intracellular structures, we stained the cells with the vacuole specific marker MBV-64. In regular cells, we normally observed the presence of a single vacuole (Figure 1D). In giant cells, we observed two patterns of staining with this specific marker (Figure 1E,F). Multiple vesicles which stained with the vacuole marker were identified in approximately 50% of giant cells, whereas the remainder displayed staining mainly in a single large intracellular vesicle. These results suggest that in some giant cells, the vacuole fragmented into multiple vesicles or the smaller vesicles failed to coalesce.

A peculiarity of the giant cells was the abnormally large width of their cell wall. This feature was most apparent when the cells were observed by transmission electron microscopy. Using this technique, we could determine that the cell wall of regular cells had a width between 50–100 nm (Figure 1G). In contrast, the width in giant cells was 20–30 larger, ranging from 2 to 3 μm (Figure 1H,I). In these pictures, it was also apparent that the density of the capsule differed between regular and giant cells. In the case of yeast obtained in vitro, the cells displayed a low density capsule with individual polysaccharide fibers attached to the cell wall (Figure 1G). In giant cells, the capsule was significantly denser in the regions close to the cell wall (Figure 1H,I).

Fungal cell suspensions recovered from the lungs of infected mice had a dark brownish colour. We hypothesized that this phenomenon could be due to *in vivo* pigment accumulation at the cell wall level, in particular melanin [26]. To investigate this hypothesis, we stained giant cells with specific mAbs to melanin [27]. Giant *C. neoformans* cells bound mAb to melanin at the cell wall level (Figure 1J,K), suggesting that this structure was melanized. In addition, we observed that giant cells showed a high degree of autofluorescence (result not shown), which has been reported in cryptococcal cells grown in certain media [28].

Scanning electron microscopy images suggested that the capsule of giant cells was different from that of cells grown in vitro. For cells grown in standard Sabouraud medium we noted that the dehydration and fixing process resulted in polysaccharide shrinkage and aggregation of fibers such that regions of the cell wall became exposed (Figure 2A). In contrast, the architecture of

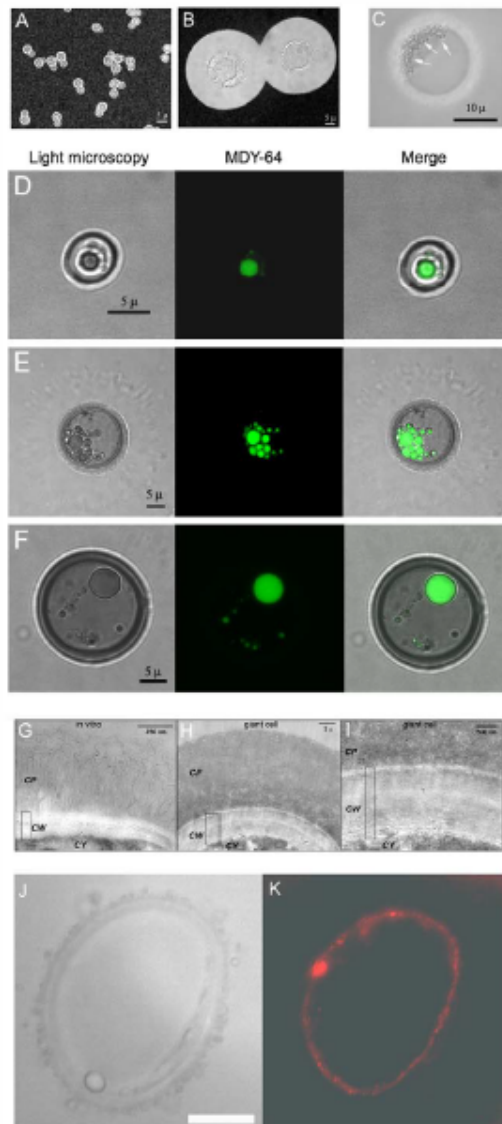


Figure 1. Morphological features of giant cells from infected mice. A) Cells grown in vitro in Sabouraud medium. B) Cell obtained from the lungs of a mouse infected with *C. neoformans* (10^5 cells/mouse) 5 weeks earlier. C) Photomicrographs of a giant cell illustrating the presence of multiple vesicles (highlighted with arrows) within giant cells. Scale bar, 10 μ m. D, E and F, vacuole staining with MDY-64 dye. Yeast cells isolated from the lung of mice four weeks after infection with 10^5 yeast cells were stained with the specific vacuole marker MDY-64 as described in Materials and Methods. Localization of the signal was performed by confocal microscopy. D) Cell of regular size. E and F) Giant cells. In all the cases, regular light microscopy, fluorescence and the merge of both images are shown. Scale bars in the left panels applies to the corresponding middle and right panels. G, H and I, transmission electron microscopy of the capsule and cell wall of regular and giant cells.

Cells grown in vitro or giant cells obtained from the lungs of mice three weeks after infection were fixed and processed for TEM. G, cell grown in vitro; H, giant cell; I, magnification of the cell wall region of the giant cell shown in B. CP, capsule; CW, cell wall; CY, cytoplasm. The rectangle indicates the width of the cell wall. JK, staining of giant cells with anti-melanin mAb. J, light microscopy; K, fluorescence. Scale bar, 10 μ m. doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g001

the capsule of giant cells appeared intact and well preserved, revealing a highly cross-linked polysaccharide net (Figure 2B) that accumulated around the cell body as a very compacted layer (Figure 2C). In addition, we frequently observed the presence of ‘holes’ in the capsule (Figure 2D, E and F), which we interpreted as pathways formed during recent budding. Transmission electron microscopy images confirmed that the capsule of giant cells was denser than the capsule of in vitro cultivated cells (Figure 1H, I).

The higher degree of cross-linking in the capsule of giant cells relative to in vitro grown cells was confirmed by treating the cells with DMSO or γ -radiation, procedures known to strip the capsule of cells of regular size [29,30,31]. γ -radiation removed the majority of capsule of giant cells, but the inner region of the capsule remained attached to the cell (Figure 3). In contrast, DMSO treatment did not affect capsular size of giant cells while it routinely strips the capsule of cells grown in vitro (results not shown). The increased resistance of the inner capsule to radiation and the overall capsule to organic solvents is consistent with a higher degree of capsular cross-linking by the giant cells.

In *C. neoformans*, complement deposition is affected by the porosity and blocking capacity of the capsule [32]. Consequently, we characterized complement localization in the capsule of giant cells as a measure of capsule penetrability. As shown in Figure 4A, complement is known to deposit in the inner location of the capsule near the cell wall of typical yeast cells [20]. When giant cells were incubated in mouse serum, we observed that complement was not detected in the inner regions of the capsule (Figure 4B). The exclusion of complement from the inner capsule is consistent with reduced permeability resulting from increased fibril cross-linking.

To ascertain whether giant cells manifested antigenic differences from cells grown in vitro we used indirect immunofluorescence with mAb 18B7. We compared cells of different size obtained from the lungs of infected mice, to avoid the possibility that factors of the immune system influenced the antigenic properties of the capsule. When stained with mAbs 18B7, cells of small size exhibited a uniform annular binding pattern (Figure 4C), which was identical to the binding of this mAb to cells grown in vitro [32]. In contrast, most of the fluorescence localized to the edge of the giant cell capsule, and this binding was diffuse and punctate (Figure 4D–F). Moreover, many cells showed a double ring, punctate pattern, with a more uniform inner ring and a rougher, more diffuse outer ring.

Chitin-like structures in the capsule were recently demonstrated by the specific binding of fluorescent wheat germ agglutinin, which binds to sialic acids and β -1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc) oligomers [33]. We used WGA to ascertain whether these structures were also present in giant cells. Cells grown in vitro bound WGA, especially at the neck between the mother cell and the bud (Figure 4G). In giant cells, these structures were particularly prominent. Protrusions into the capsule were longer, reaching several microns (Figure 4H).

Replication of giant cells

Giant cells were viable, since they replicated when placed on fresh agar plates. Daughter cells emerging from giant cells were

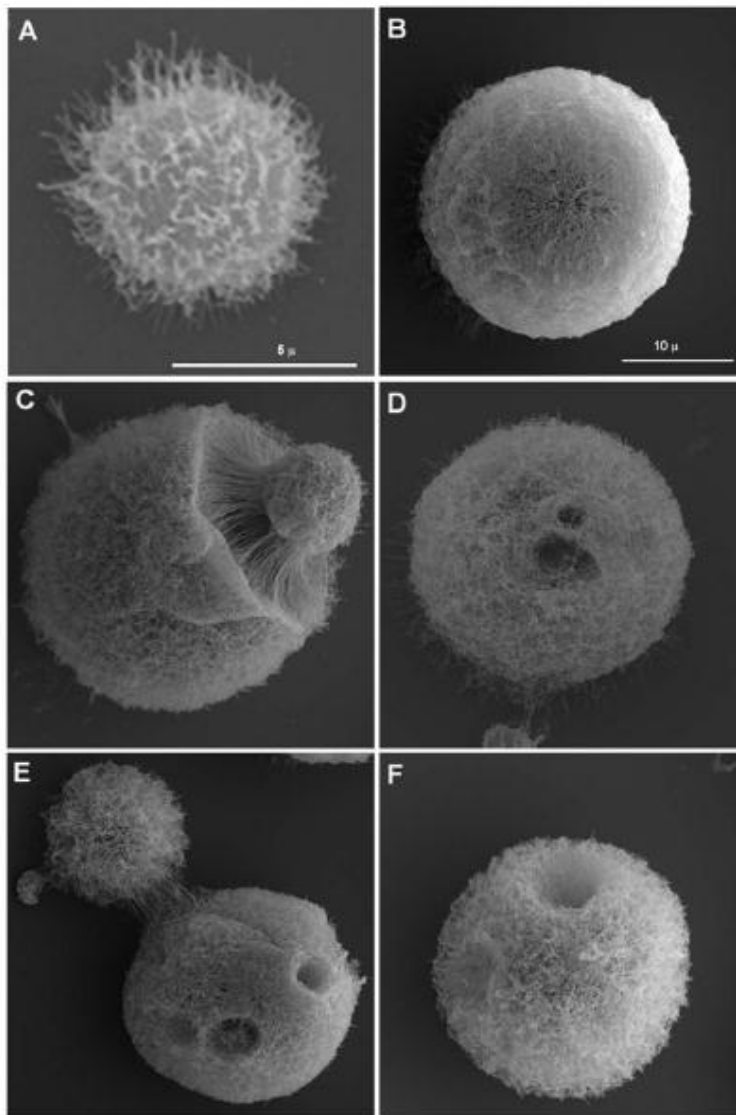


Figure 2. Scanning electron microscopy of cells grown in vitro and of giant cells. A) Cell in vitro grown in Sabouraud. B-F) Giant cells isolated from lung. Scale bar in panel B (10 µm) also applies to panels C-F.
doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g002

not trapped inside the thick polysaccharide capsule, but rather traversed it in less than 0.08 seconds (Figure 5A and B, supporting Videos S1 and S2). In some cells, movement through the capsule was much faster, taking less than 0.01 seconds (Figure 5C, supporting Video S3). By measuring the distance travelled through the capsule by emerging buds and the transit time we estimated that the daughter cells traversed the capsule at 20–50 m/h, which is a remarkably high velocity for a microscopic unicellular particle in a gelatinous environment.

This data suggested the existence of a motive force propelling and separating the buds from the mother cell's capsule. We observed that giant cells could produce several daughter cells over brief periods of time (2–3 hours), with buds always emerging from the same cell site (data not shown). Despite ejection, the daughter cells remained close to the capsule of the mother cells where they replicated, producing abundant progeny around the giant cells. Even after the giant cells were surrounded by daughter cells, new buds were still ejected with significant force, since they were able

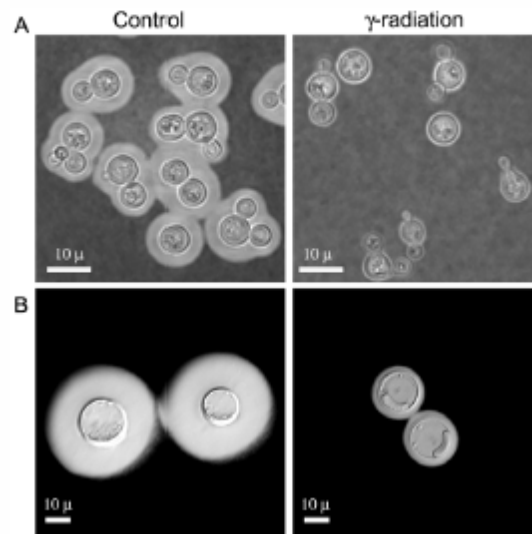


Figure 3. Capsule release by γ -radiation. Cells of in vitro-enlarged capsule (A) and giant cells (B) were exposed to γ -irradiation, suspended in India ink, and observed under the microscope. Images of representative cells are shown before (control, left panel) and after irradiation (γ -irradiation, right panel). doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g003

to displace and move the surrounding cells upon impact (see supporting Video S4).

When placed on agar, we observed that not all giant cells produced daughter cells after 24 h, suggesting that some of these cells were metabolically arrested, or had died prior to or during the isolation procedure. To measure the percentage of replicating cells we obtained giant cells from two mice and counted the proportion of giant cells producing colonies after 24 h on agar with a microscope. The percentage of giant cells reproducing was 60% and 73% for each mouse, respectively, indicating that the majority of giant cells were viable.

As a secondary technique for testing giant cell viability we used the method based on the reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) by alive cells. Giant cells manifested a strong capacity to reduce XTT, which was approximately 100-fold greater than the activity shown by the same number of cells grown in vitro (data not shown). This result indicates that giant cells are metabolically active.

In vitro cellular growth in minimal media and its relation to cell aging

We tried to induce giant cell formation in vitro by incubating the cells in different media. When we incubated the cells in minimal media, around 4–5% of the cells showed a marked increase in cell size over 4 days. These cells reached up to 25–30 μ m in diameter (capsule included), approximating, but not quite reaching the size of the giant cells recovered from mouse lungs. In addition, these in vitro giant cells showed other phenotypic differences with the giant cells obtained in vitro, such as a smaller capsular size and a lack of enlargement of the cell wall (result not shown). Although this in vitro medium only partially reproduced the gigantism phenomenon, we used it to study if there was any relationship between cellular enlargement and the age of the cells. We hypothesized that massive cellular growth required a

prolonged period of time, so the majority of the giant cells obtained would be originated from the initial inocula. To explore this hypothesis, we labelled the cells with complement. Complement proteins, especially C3, bind to the capsule covalently without inhibiting cell growth and do not segregate to buds after replication [34]. Consequently, we labelled cells grown in Sabouraud medium with mouse C3 and then incubated them in minimal medium (which induces a small population of giant-like cells) and Sabouraud medium. At time zero, all the cells were labelled with complement (Figure 6A), but after 4 days of incubation in minimal medium, only a few cells remained labelled (Figure 6B). When we measured the average size of the cells with complement bound after four days of incubation in minimal medium, we found that these cells had a significant larger size than the cells incubated in Sabouraud medium (Figure 6B). We repeated this experiment, placing the cells in parallel in minimal medium, which induces cell enlargement in some cells, and in Sabouraud medium, in which cell enlargement is not expected. Then, we measured cell size of complement-labelled and non-labelled cells. In minimal medium, we observed that the complement-stained cells were significantly larger than the unlabelled population (Figure 6C, D). Large cells were not found in Sabouraud medium after C3 labelling and there was no difference in the size of cells with and without C3 labelling (Figure 6C, D). This result indicates that cellular enlargement and giant cell formation is correlated with the age of the cells, such that the giant cells are the older cells in the culture.

DNA content

We hypothesized that giant cell formation was a consequence of continued cell cycle progression without cellular fission. In other fungi, cell size can be related to DNA content [35,36]. Using flow cytometry to measure DNA content, we found that giant cells had low permeability to propidium iodide by regular staining protocols (results not shown), but could be permeabilized by heating at 60°C for 45 minutes. As mentioned above, cells from the lungs of mice infected for 3–4 weeks showed strong autofluorescence, so we measured the intensity of the signal in the presence or absence of propidium iodide. We first analysed the difference in the forward scatter (FSC, cell size) and side scatter (SSC, cell complexity). When we compared these parameters, we observed a population of larger yeasts in the cells isolated from the lung that was not present in the yeast cells obtained in vitro, as was expected with the presence of giant cells in vivo (Figure 7A, B). This population was defined as region 1 (R1), which contained the giant cells present in the population. To estimate the DNA content, we added propidium iodide to these samples. When we measured the propidium iodide staining, we found that there was a high variation in the DNA content in the cell population obtained from lungs (Figure 7C), which implied a high variation in the DNA content of cells in vivo. Fungal cells isolated from the lungs of infected mice also displayed significant autofluorescence in the absence of propidium iodide staining. To assess the staining of giant cells, we subtracted the autofluorescence of the cells present in region 1 from the fluorescence value determined in the presence of propidium iodide. The mean fluorescence intensity for the giant cells was almost 10^3 fold higher than the signal measured in cells grown in vitro (Figure 7D). This result suggested that giant cells contain multiple copies of DNA. To quantify the ploidy level of the giant cells further, we performed real time PCR to amplify the ITS1 region from ribosomal DNA. We included controls of purified genomic DNA of known concentrations, which yielded a linear relationship between crossing point values and DNA concentration. When we compared 300 giant and regular cells

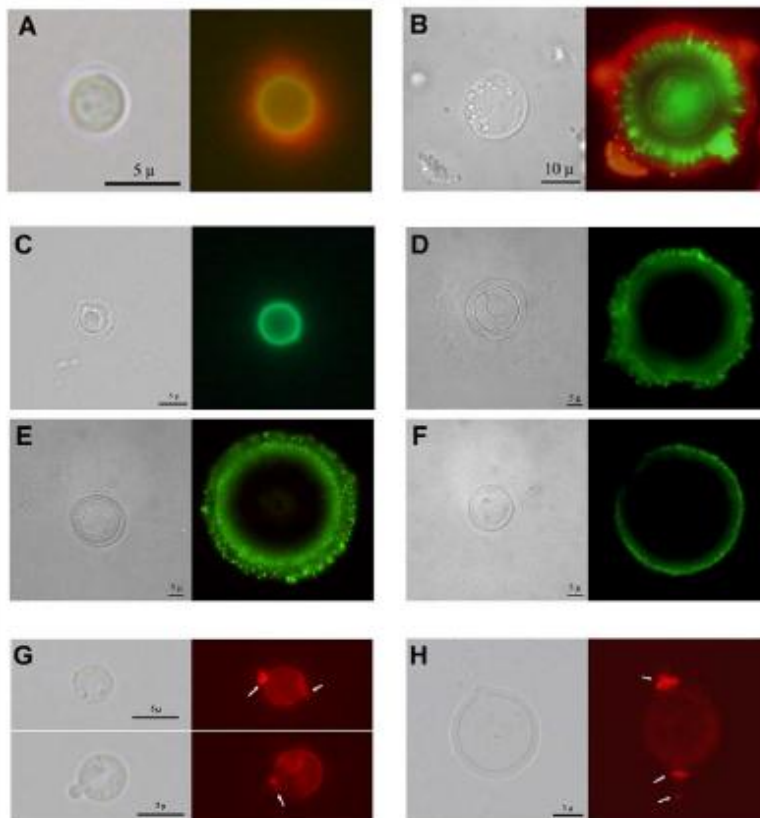


Figure 4. Differences in capsular structure between regular and giant cells. Yeast cells from lung extracts were incubated in mouse serum and labelled with antibodies to C3 and GXM. A) cell of a regular size; B) giant cell. Light microscopy and complement localization (green fluorescence) and capsule edge (red fluorescence) are shown. C–H) capsular features shown by fluorescence. C–F) Indirect immunofluorescence with GXM-binding mAbs. MAb 18B7 labelling of cells of regular size (C) or giant cells (D–F) isolated from lung of infected mice. Light microscopy and fluorescence pictures are shown for each cell. G–H) Binding of wheat germ agglutinin to *C. neoformans*. The presence of chitin-like structures in the capsule was studied by the binding of WGA to the cells as described in Materials and Methods. G) Cells grown in Sabouraud and then transferred to 10% Sabouraud buffered at pH 7.3 with 50 mM MOPS buffer to induce capsule enlargement. H) A representative giant cell isolated from the lungs of infected mice. Arrows indicate the major regions where WGA binds to the cells. Scale bars in C–D in light microscopy panels denote 5 microns and apply to the fluorescence images. doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g004

there was a difference in the Ct values of more than 3 cycles (36.95 in giant cells versus 40.00 in regular in vitro grown cells). When we estimated the amount of DNA present in each condition according to a standard curve generated using different concentrations of genomic DNA, we calculated that the amount of DNA in each giant cell was 1.3×10^{-7} ng. In contrast, in vitro cultivated cells contained 8.4×10^{-9} ng. This result indicated that giant cells contained 16× DNA than regular cells. This experiment was repeated using different cell concentrations and consistent results were obtained (result not shown).

DAPI was used to directly observe the nucleus of the giant cells. This staining revealed that both regular (Figure 7E) and giant cells (Figure 7F) contained a single nucleus.

Signal transduction pathways involved in giant cell formation

We investigated the potential involvement of two of the major signal transduction pathways in *C. neoformans* (cAMP and Ras1 [37,38]) in

giant cell formation. Ras1-deficient cells produced giant cells in the lungs of infected mice (Figure 8A). In contrast, mutants unable to accumulate cAMP (lacking adenylate cyclase encoded by the *GAC1* gene) did not produce giant cells during murine infection (Figure 8A), suggesting that this pathway was required for giant cell formation.

The absence of giant cells in mice infected with the cAMP mutant was associated with a reduced fungal burden. Hence, the lack of giant cells with this mutant in vivo might be related to the ability of the host to rapidly clear the fungus. For this reason, we examined whether a *cac1* mutant formed giant cells in minimal media. The *cac1* mutant failed to produce giant cells, whereas a significant proportion of cells of the wild type (H99) and reconstituted (*cac1/GAC1*) strains manifested cellular enlargement (Figure 8B), confirming that cAMP pathway is involved in giant cell formation. To further characterize this phenotype, we analysed the forward and side scatter profile of the cells from the three strains by flow cytometry, since this type of plot allows for clear differentiations in cell size. As shown in Figure 8C, the *cac1*

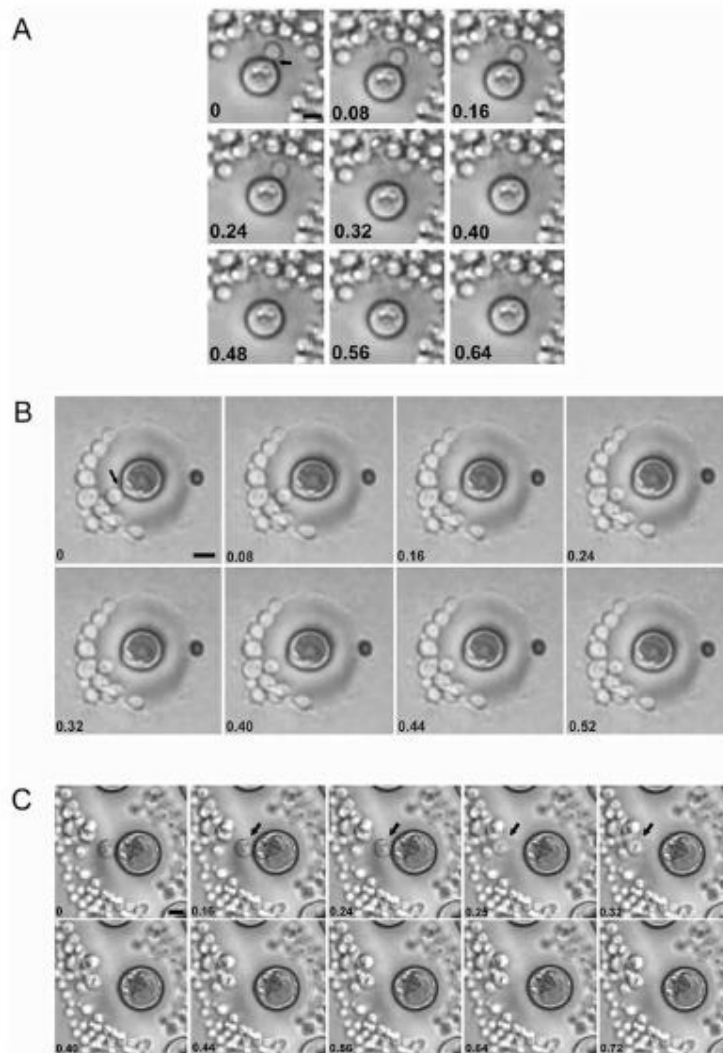


Figure 5. Time lapse images of replicating giant cells in vitro. Giant cells were obtained from lungs of four weeks-infected mice and placed on Sabouraud plates. After 18 h, the growing colonies were monitored under the microscope. The digital videos were processed with Windows Movie Maker software. This software allowed the conversion of the videos into single pictures, each one represented as a different frame of the video. The number in each picture corresponds to the time in seconds. A, B and C correspond to three different budding events. Corresponding videos are included as supporting information files.
doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g005

mutant yielded a very homogenous population of relatively small FSC and SSC values. In contrast, the wild type and reconstituted strains produced more heterogeneous populations, in which cells with larger FSC and SSC values were measured, indicating the appearance of cells of larger size.

Distribution of fungal cell size during infection and correlation with inflammation

The distribution of cell sizes in vivo was extremely variable depending on the experimental conditions. Under our standard

conditions (infection of 6–8 weeks old mice with 10^5 yeast cells) we consistently found that the proportion of giant cells in the lung was between 1–10%, with variation between individual mice and between experiments. However, in several experiments, we occasionally found that the proportion of giant cells was higher than 90% of the lung fungal cell population. Curiously, in those experiments where the proportion of giant cells was very high, there were no obvious signs of disease and the mice looked healthy. We decided to investigate this observation in more detail by studying the relationship between inoculum and giant cell

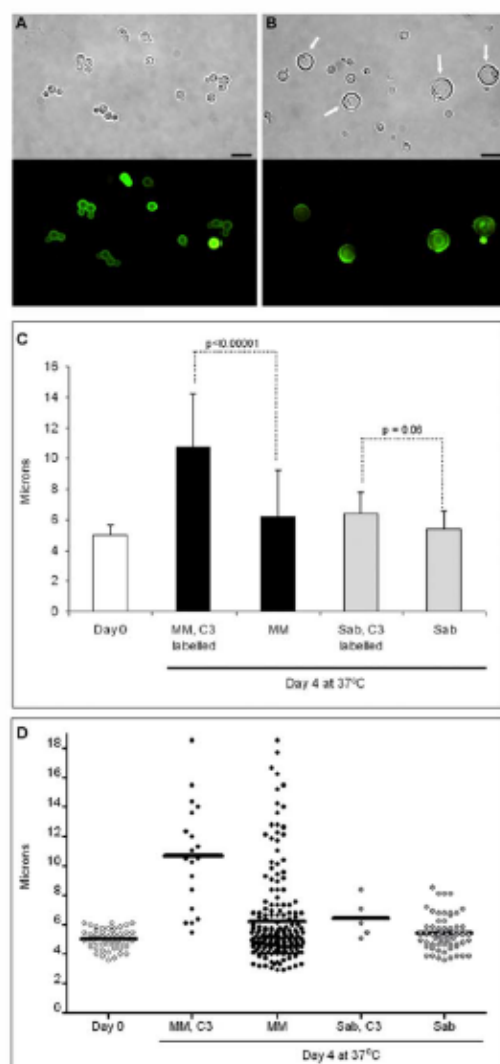


Figure 6. Giant cell formation in vitro. Cells from H99 strain were grown in Sabouraud, washed and labelled with mouse serum. C3 deposition was then detected by immunofluorescence (A). After incubation in mouse serum, cryptococcal cells were transferred to minimal medium (MM) for four days, and C3 was detected (B). Scale bar in A and B, 10 μ m, and apply to the corresponding fluorescence panels. C) Cells were grown and labelled as in A (Day 0 sample), transferred to Sabouraud or MM for 4 days at 37°C, and the cell size was measured in the C3 labelled population ("MM, C3 labelled" and "Sab, C3 labelled") and in the whole population, including both C3 labelled and unlabelled cells. The average and the standard deviation (error bars) are plotted and p-values for the highlighted comparisons are shown. At least, 20–50 cells were counted, except in the "Sab, C3 labelled" samples, where C3 positive cells were rarely identified due to the overgrowth of the culture. Kruskal-Wallis test was used to assess statistical differences. D) Scatter representation showing all the cells plotted in panel B. The line in each sample denotes the average of the distribution.
doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g006

formation. We hypothesized that infections with low inocula could reproduce chronic or latent asymptomatic infections. For this purpose, we performed infections with high (10^6 /mouse) or a low dose (10^4 cells/mouse).

Mice infected with high inocula consistently developed typical cryptococcal disease, as indirectly shown by progressive weight loss (Figure 9A). However, we found a high variation in outcome when the mice were infected with a low inoculum. Most of these mice (2 of 3) developed disease comparable with that seen after infection with a high dose. Severe disease was characterized by dense inflammation in the lungs, increasing the size and weight of these organs (1.3–1.8 grams) such that they accounted for 7–8% of the total body weight (Figure 9B). In contrast, the lung mass of asymptomatic mice (control mice and one of the mice infected with low inocula) was approximately 0.45 grams and ~1% of total body weight. As expected, mice developing severe disease had a significantly higher number of CFUs ($>10^6$ /lung) than the mice that did not manifest obvious signs of disease, where the number of CFUs remained very low ($<10^4$) during the experiment (Figure 9C). When we recovered the fungal cells from the lungs of these mice, we found profound differences in the size of the yeast cells. The average cryptococcal cell size in mice receiving a high inoculum was around 15–20 μ m, which was significantly larger than the size reached when grown in vitro in rich medium (Figure 9D, Sabouraud medium). Although approximately 5–20% of the yeast cells met criteria for giant cells, the enlargement of the majority of cells isolated was mainly due to increase in the capsule size, so the size of these populations was only slightly different from the size reached when capsule size is induced overnight in vitro (see Figure 9D, in vitro enlarged capsule size). We were able to isolate around 1.3×10^3 *C. neoformans* cells from the lungs of asymptomatic, low dose infected mice and the average yeast cell size was around 40 μ m (Figure 9D). Notably, approximately 70% of the isolated yeast cells were giant forms.

We also analysed the proportion of giant cells in the lungs using Classification and Regression Trees (CART) analysis. Using this approach, we found that there was a strong association between the total fungal cell size in the lungs and the degree of inflammation, such that high inflammation was predicted when the average fungal cell size was below 36 μ m (Figure 9E). This prediction is in accordance with our initial criteria of defining giant cells as those with a cell diameter greater than 30 μ m. When we plotted the corresponding ROC curve, we found that the region under the curve was 0.80, which provides strong support for the prediction. On the other hand, the model could not efficiently predict the proportion of giant cells according to inflammation, due to the low number of yeast cells found in lungs without significant inflammation.

The relationship between the proportion of giant cells and inflammation was confirmed histologically. In control mice, the lungs revealed the typical structure in which alveolar spaces were present throughout the lungs (Figure 10). In the infected mice, we only observed this benign histology in the asymptomatic mouse (mouse 1 of the group infected with 10^4 yeast cells, Figure 10). In the rest of the low dose (Figure 10) and all of the high dose infected mice (result not shown), dense inflammation was observed and alveolar spaces contained numerous yeast cells and inflammatory cells.

We performed another experiment using older mice (14–16 weeks old), which are more resistant to infection, and a lower infective dose than in the experiment previously described. We infected with either a low (10^5 cells/mouse, 10 mice) or a high dose (10^6 cells/mouse, 3 mice), and measured fungal cell size after a month of infection. In this new model, the mice did not develop

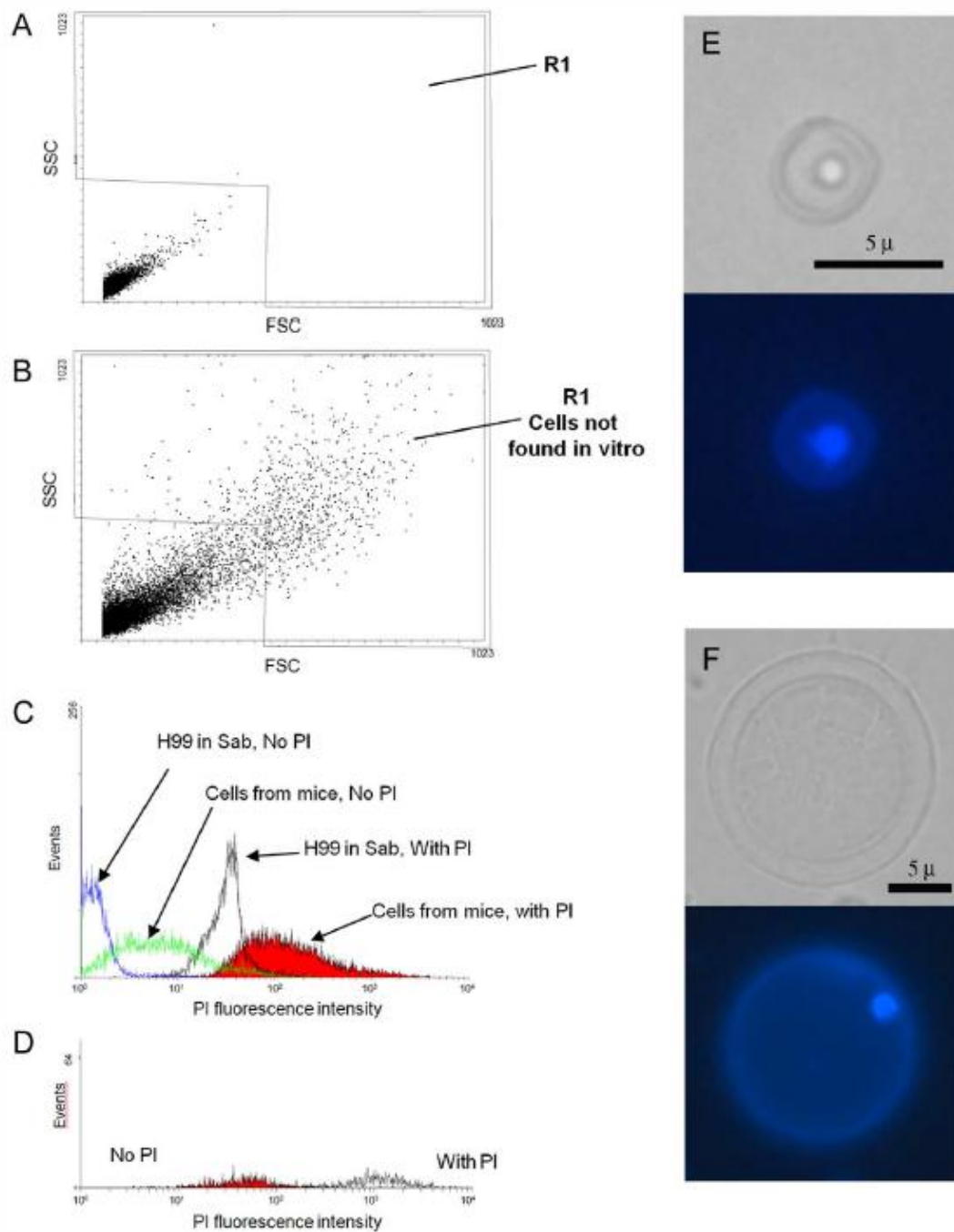


Figure 7. Determination of DNA content by cytometry and DAPI staining. Fungal cell samples were obtained from the lungs of one mouse 3 weeks after challenge with 10⁵ *C. neoformans* cells. As a control, cells grown for 24 hours in Sabouraud were also used. The cells were fixed after incubation at 60°C for 45 minutes. Propidium iodide was immediately added at 10 μg/mL DNA content and the labelling was determined by the propidium iodide fluorescence intensity. Matched samples were subjected to cytometry without propidium iodide. A) FSC/SSC plot of cells grown in

Sabouraud. B) FSC/SSC of cryptococcal cells from lungs. Region 1 delimits all the cells whose size and complexity are not found in cultures grown in vitro and presumably cover all the cells with increased cell size. C) Propidium iodide fluorescence intensity of the four samples analyzed: in vivo isolated cells (plus and minus propidium iodide) and in vitro cells (plus and minus propidium iodide). D) Propidium iodide fluorescence intensity of the cells from the lung present in R1. E–F) DAPI staining. Yeast cells obtained from the lungs of mice infected with 10^5 yeast cells were stained with DAPI. E) cell of regular size; F) giant cell. Corresponding light microscopy and fluorescence images are shown. Scale bar in the light microscopy panels apply to the fluorescence images.
doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g007

any visible sign of disease. When the mice were sacrificed after one month, only one of the mice infected with the high dose showed inflammation in the lungs (table 1, 10^5 , mouse 2). In the group infected with low dose, we did not find yeast cells in 3 mice, indicating that the infection had been cleared. In the other seven mice, we found a low number of yeast cells, suggesting a chronic asymptomatic infection. In six of the seven mice, the average size of the fungal cells was above $30\ \mu\text{m}$, and the proportion of giant cells was between 50–90%. When the mice were infected with a higher dose, the two mice in which no inflammation was detected showed fungal cell sizes above $30\ \mu\text{m}$, with a proportion of giant cells around 70–80%. In the mouse with inflammation (mouse number 2), the average fungal cell size was smaller ($14\ \mu\text{m}$), and the proportion of giant cells was less than 5%. This data supports the notion that the highest proportion of giant cells is found in hosts with chronic and longstanding infection.

Susceptibility to oxidative stress

We measured the susceptibility of giant cells to oxidative stress produced by incubation in H_2O_2 . Giant cells were significantly more resistant to killing by oxidative stress than cryptococcal cells grown in vitro, with survival rates of $19\% \pm 10$ and $46\% \pm 14$ for cells grown in vitro and giant cells, respectively ($p = 0.014$).

In vitro interaction of giant cells with phagocytic cells

To further characterize the interaction of giant cells with host effector cells, we incubated macrophage-like cells with giant cells and observed the outcome of the interaction using live-imaging microscopy. When small-sized cryptococci were exposed to macrophages, we observed rapid and avid phagocytosis, yeast cell transfer between macrophages, fusion of infected macrophages after division, and intracellular replication of the *C. neoformans* cells, as described previously [39,40,41,42,43] and shown in supporting Videos S5, S6 and S7. None of these phenomena were observed when macrophage-like cells were exposed to *C. neoformans* giant cells, indicating that the interaction between these fungal cells and macrophages was different and had different outcomes. Although in some cases the macrophages seemed to adhere to the giant fungal cells, there was no phagocytosis or macrophage fusion after division (supporting Videos S8 and S9), indicating that macrophages could not cope with the giant cells.

Discussion

Cryptococcus neoformans giant cells have been occasionally described in the literature primarily as curiosities in histological tissue sections [22,23,24], but their importance in pathogenesis has remained obscure. Apart from the fundamental problems in cell biology posed by the mechanisms responsible for the transition to gigantism, we considered that the presence of fungal giant cells would pose a major problem for the immune system simply by virtue of their size.

Giant cell formation was associated with several changes to the capsule relative to the typical cells observed in vitro. These changes represented an exaggerated response in capsule, cell body, and cell wall size during infection. Moreover, the resistance to

capsule shedding after γ -radiation exposure suggests a more compact and dense structure. Such an increase in capsular compactness could confer a survival advantage in vivo since the capsule is known to protect against oxidative fluxes of the types produced by immune effector cells [21]. Consistent with this idea, we have observed that giant cells are more resistant to oxidative stress.

Giant cells maintained their enormous size ex vivo, although they produced smaller cells in agar at replication rates similar to those observed in vitro. Another remarkable aspect of the budding process is the rapidity with which the buds traversed the capsule, especially considering the denseness and compactness of the polysaccharide noted by scanning and transmission electron microscopy. However, we did observe holes in the capsules of giant cells with dimensions that approximated the size needed for daughter cells to emerge. Similar capsule holes have been occasionally described in encapsulated cells grown in vitro [44]. The strong binding of WGA to these cells also suggests the presence of chitin-like structures, which have been proposed to be involved in the movement of the bud through the capsule of the mother cell [33]. Given prior work noting tunnel-like structures formed around buds [33,34], it is possible that the rapid egress of buds from the mother cells represent movement along such structures that provide a non-obstructed conduit through the capsule.

The cellular mechanisms by which cryptococcal cells enlarge to gigantic sizes are not known and a complete understanding of this phenomenon is beyond the scope of the current work. Nevertheless, we explored the potential mechanism of cell division without fission as a way for progressively increasing mass. Cell growth is intimately dependant on the cell cycle. The cells need to reach a critical size for cell cycle to progress, and there is a constant ratio between the mass of the cell and its DNA content (reviewed in [45,46,47,48]). In plants, the phenomenon is striking, because their cells can enlarge in size by 100- or even 1000-fold, and this is achieved by endoreduplication, which is the process in which the cell increases the ploidy of the cells through several rounds of DNA replication [49]. Recently, it has been shown that bacteria from the genus *Epulopiscium*, which grow to lengths of 200–300 μm and widths of 40–50 μm , have extreme polyploidy, generating tens of thousands of copies of their genome [50]. In a process that may be relevant to cryptococcal gigantism, there are some symbiotic bacteria that undergo an important differentiation process achieved by genome amplification by endoreduplication in plant nodules resulting in significant cell enlargement [51] and provide beautiful examples of how some factors of symbiotic plants regulate the cell cycle of their symbiotic microorganisms.

We hypothesized that giant *C. neoformans* cells achieved their size by repeatedly entering G1 cycles without dividing. To investigate this possibility we stained cells for DNA. Cells recovered from infected animals produced a noisy FACS profile that was interpreted as being consistent with cell-to-cell variation in DNA content. By analyzing cell size and fluorescence intensity we showed that cell size correlated with DNA content, thus establishing that larger cells have more DNA, a result confirmed by real-time PCR. These findings are consistent with a mechanism for DNA replication without cell fission.

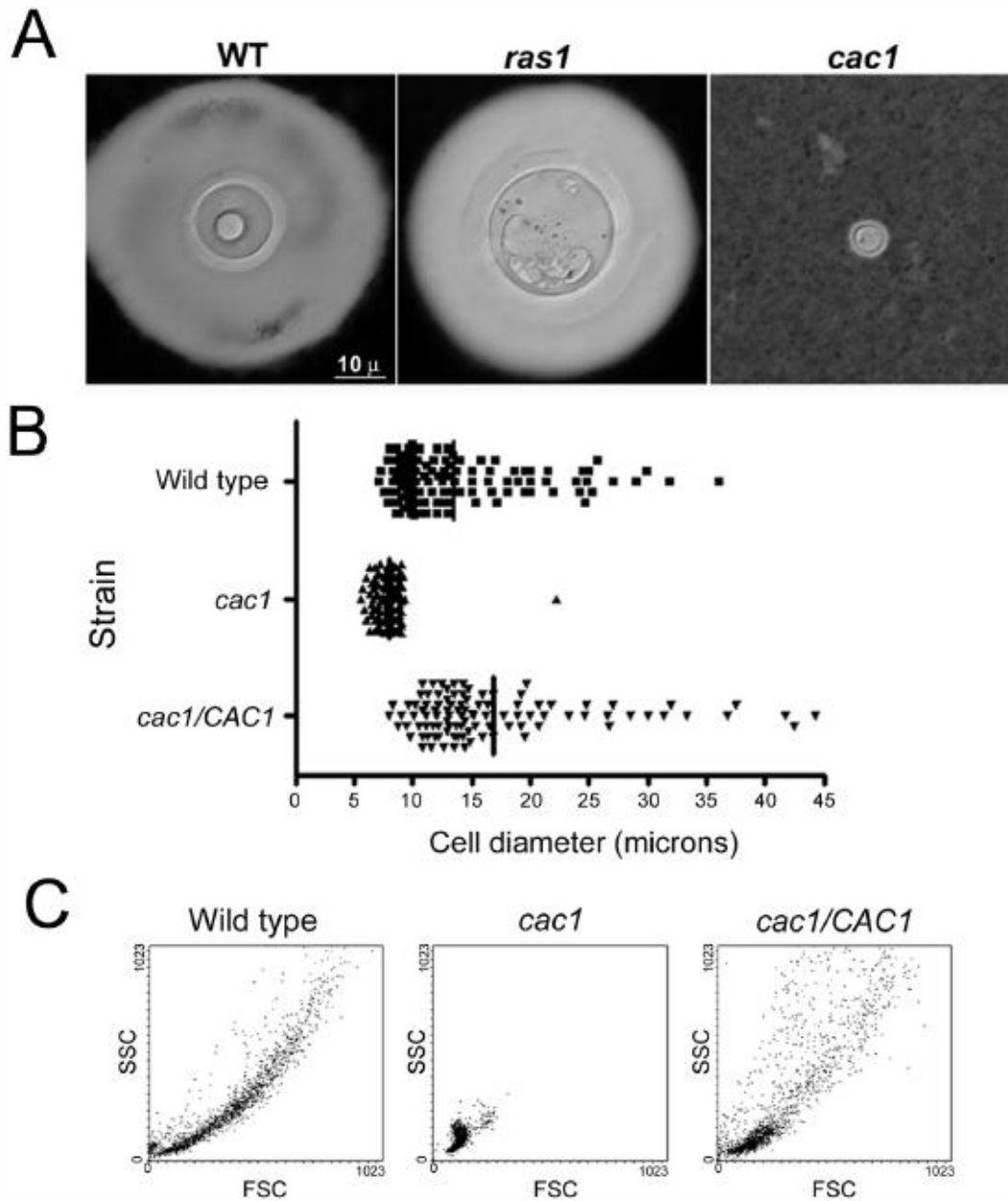


Figure 8. Giant cell formation depends on cAMP, but not Ras1. C57BL/6J mice were infected with H99, *ras1* (*Ras1* mutant) and *cac1* (adenylate cyclase mutant) strains (10^6 per mouse). After three weeks, the mice were sacrificed and fungal cells were isolated. Representative pictures of fungal cells are shown. A) India ink microscopy, scale bar in left panel applies to all the pictures. B) Cell size distribution of wild type, *cac1* mutant and its reconstituted strain (*cac1/CAC1*) after 5 days of growth in minimal medium at 37°C. The cells were suspended in India ink to delimit the capsule, and the diameter of the cells (capsule included) was measured microscopically. C) Forward Scatter/Side Scatter plot of *cac1* mutants after incubation in minimal medium. The cells described in B were analysed by flow cytometry to obtain the corresponding forward scatter (FSC, correlated with cell size) and side scatter (SSC, correlated with cell complexity). doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g008

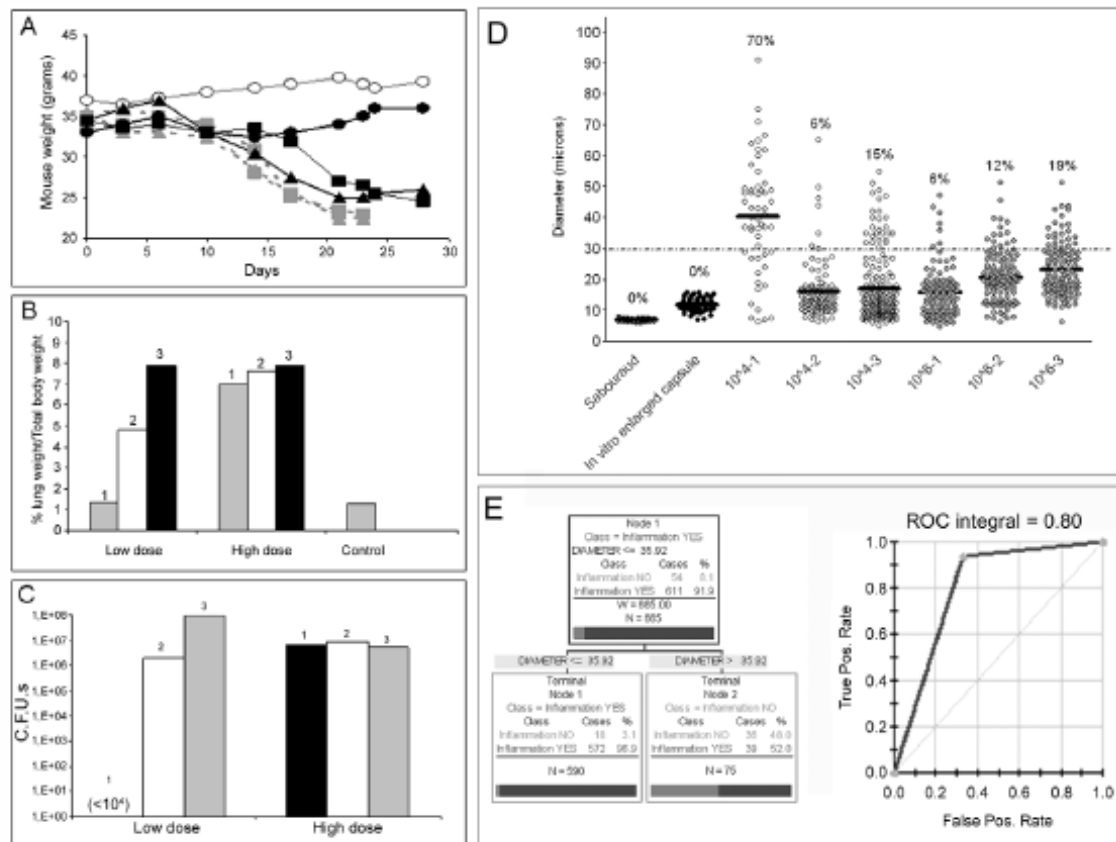


Figure 9. Parameters of disease in mice infected with *C. neoformans* and giant cell proportion in the lungs. CD1 mice were infected with different inocula of *C. neoformans*, and different parameters were monitored during the course of the infection. A) Body weight of mice infected with a low dose ($\sim 10^4$ cells, black line, closed symbols, $n=3$) or a high dose (10^6 , grey line, grey symbols, $n=3$) of *C. neoformans*. A control mouse, injected with PBS, is also shown (grey line, open symbols). B) Proportion of the lung weight in respect to body weight, as an indicator of lung inflammation. C) CFUs from the lungs of mice described in A and B. D) Cell size of *C. neoformans* in vitro and in vivo. Cell size (capsule included) was measured in fungal samples obtained from mice infected with high or low *C. neoformans* doses (see Figure 9A-C). As a control, cell size was measured in cells grown in vitro in Sabouraud or in 10% Sabouraud buffered at pH 7 with 50 mM MOPS to induce capsule enlargement. The number expresses the proportion of giant cells in each sample, defined as cell with a diameter above 30 μm . The line in each distribution represents the average of the population. E) Results of the CART analysis. Left panel, prediction of the correlation between inflammation and total fungal cell size. A cell size lower than 35.92 μm was strongly associated with increased inflammation. Right panel, corresponding ROC curve, showing a region under the curve of 0.8. doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g009

The proportion of *C. neoformans* giant cells in infected mouse lung was a function of total microbial burden and pulmonary inflammation. Okagaki et al also found differences in giant/titan cell proportions during infection experiments with MAT α and MAT α strains, with the proportion of titan cells being higher when mice were co-infected with both mating types (Okagaki et al, see related article in the current PLoS Pathogens issue). These authors have concluded that titan cell formation is induced by the pheromone signalling pathway. Taking our and their results together, we can conclude that gigantism is a morphological response to host environments that impact cAMP and pheromone signalling pathways, which could regulate the cell cycle with the final purpose of generating giant cells during infection. The fact that the survival of the host is not compromised when the proportion of giant cells is high suggests that giant cells can survive in a local environment in the host for protracted periods of time without disseminating in the setting of intact host immunity, a

finding in agreement with Okagaki's report. This notion is consistent with reports that a moderate increase in cell size due to capsule enlargement interferes with *C. neoformans* dissemination from the lung [52,53].

Various studies have suggested that *C. neoformans* dissemination is associated with intracellular survival inside macrophages [54,55,56,57], but this model cannot be applied to giant cells since they exceed the size of macrophages. Hence, the increased size of the giant cells is likely to be an impediment for their dissemination as they are simply too large to cross biological barriers and/or transverse capillary diameters. Nevertheless, such cells are viable and capable of producing small sized variants when placed in suitable conditions, such as rich agar. Taken together, our findings suggest that giant cell formation could provide the fungus with a strategy for prolonged survival in a host. Cells could conceivably survive through the life of the host and then return to soils when an animal dies. Alternatively, the giant cells could await

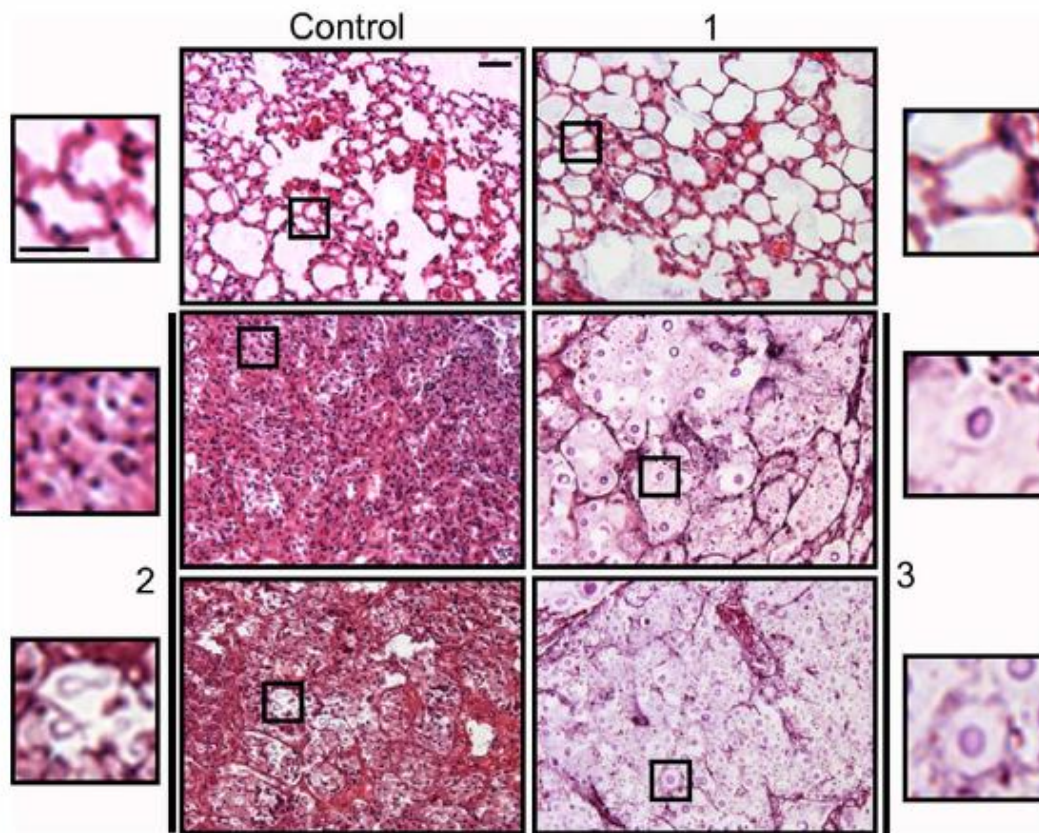


Figure 10. Histological sections of mice infected with different *C. neoformans* inocula. Tissue sections from mice described in Figure 9 were stained with hematoxylin and eosin. Tissue section of control mouse (upper left panel) and three different mice infected with a low *C. neoformans* inocula. Mouse 1, upper right panel; mouse 2, middle and lower left panels; mouse 3, middle and lower right panels (for mice 2 and 3, two different regions are shown). For each panel, a magnification of a region is shown, which is delimited by an inset. Scale bar in upper left magnification, 25 μ m, and applies to the rest of amplified panels.
doi:10.1371/journal.ppat.1000945.g010

Table 1. Fungal cell size and proportion of giant cells in 16-weeks old mice infected with low and high doses of H99 strain.

	Yeast dose (cells/mouse)									
	10 ³							10 ⁵		
Mouse number	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
lung weight (mg)	240	390	326	340	339	240	309	550	860	413
Mean \pm St. Dev (μ m)	34 \pm 6	33 \pm 6	31 \pm 13	20 \pm 5	49 \pm 9	46 \pm 10	44 \pm 11	34 \pm 12	14 \pm 5	40 \pm 10
Giant cells (%)	61	74	50	9	91	80	90	67	4	82
Lower 95% CI	32.3	29.5	21.4	15.5	42.1	30.4	39.4	30.1	13.3	34.1
Upper 95% CI	36.3	37.3	40.5	25	57.6	62.4	49.8	37	16	46.1

Ten CD1 mice (16 weeks old) were infected with 10³ yeast cells/mouse, and three mice were infected with 10⁵ yeast cells/mouse. The animals were killed after a month, and the weight of the lungs was measured. Fungal cells were isolated as described in Materials and Methods, and the mean value, standard deviation, proportion of giant cells (above 30 μ m), and the lower and upper 95% confidence interval were calculated. In three mice of the group infected with a low dose, we did not find any yeast cells, so the data of the other seven mice is represented.
doi:10.1371/journal.ppat.1000945.t001

permissive host conditions such as in the setting of advanced HIV infection, immunosuppression after organ transplant, or other conditions impairing host immune responses that lead the fungus to proliferate to produce abundant progeny. In this context, it is noteworthy that micro-yeast forms have been described in the lung of infected mice [18,58], suggesting another form of size polymorphism at the other end of the scale. All these findings indicate that during infection, *C. neoformans* can display a wide variation in cell sizes, ranging from micro-forms to giant cells, and suggest that each of these morphotypes have different roles in the pathogenesis of persistence and dissemination.

We are aware of occasional reports of gigantic cells in other fungal species. For example, giant *Candida albicans* cells with diameter up to 30 µm have been described [59,60], and similar large cells have been described for other pathogenic fungi during infection. The arthroconidia of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* swell to form giant spherules (typically 30–150 µm in diameter) during mammalian infection and the spherules produce a large number of endospores derived from the cell membrane, each with a single nucleus [35]. When the spherule is mature, the cell membrane is dissolved and the endospores are released. Another example of fungal giant cells occurs in species from the genus *Emmonsiella*, responsible for adiaspiromycosis in humans. *Emmonsiella crescent* cells reach up to 200–700 µm during infection and these forms are multinucleate. *Emmonsiella parva* forms cells up to 40 µm, and they also contain several nuclei [36]. It is possible that gigantism is a general property of unicellular fungi that is expressed under certain conditions. If this is the case, the reproducibility of giant cell formation during cryptococcal infection provides an excellent experimental system for the study of this phenomenon.

In summary, *C. neoformans* cells can achieve gigantic dimensions during infection and the phenomenon suggests that gigantism may be considered a new form of fungal dimorphism. The occurrence of extraordinarily large cells may enable an adaptation for persistence in certain hosts. The findings for *C. neoformans* together with the similar reports in other fungi suggest that this may be a general mechanism for fungal survival under certain environments and possibly contribute to persistence during host-pathogen interactions.

Materials and Methods

Yeast strains and growth media

For most experiments, serotype A H99 strain was used [61]. In some experiments the following strains were also used: 24067 (serotype D, ATCC); B3501 (serotype D, [62]); RPC3 (*acI::URA5*, [37]); RPC7 (*acI::URA5/CAC1*, [37]); LCC1 (*ras1::ADE2*, [38]) and different clinical isolates from the Yeast Collection of the Spanish Mycology Reference Laboratory (CL2132, CL4860, CL5154, CL5632, CL5707, CL5066 and CL4979). Yeasts were grown in Sabouraud liquid medium at 30°C with moderate shaking (150 r.p.m.). In some cases, the yeast cells were grown in minimal media (29.4 mM KH₂PO₄, 10 mM MgSO₄, 13 mM Glycine, 3 µM thiamine, 15 mM glucose, pH 5.5). For melanization, L-DOPA containing medium was prepared as in [63]. In other experiments, the cells were transferred from the original Sabouraud culture to 10% Sabouraud medium pH 7.3 with 50 mM MOPS buffer, as described in [17], to induce capsule enlargement in vitro.

Mouse strains and infection models

Six to eight weeks old female BALB/c, C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bethesda, MD) and CD1 mice (Charles River

Laboratories) were used in this study. In some experiments, older CD1 mice (16 weeks old) were also used. *C. neoformans* strains were grown at 30°C, washed with sterile PBS, and suspended at specific cell densities. Fifty microliters of the selected yeast cell suspension were injected intratracheally into mice previously anesthetized with a xylazine/ketamine mixture, as described [64].

Histology sections of lung tissues

Lungs were excised from mice at different infection times and fixed in formalin for 48 h at room temperature. The tissues were then dehydrated and embedded in paraffin using an STP120 Tissue Processor (Microm International, Walldorf, Germany). Then, 5 µm tissue sections were obtained using a Leica RM2245 microtome and placed on glass slides. Hematoxylin/eosin staining of the tissue sections was performed using standard protocols.

Fungal cells isolation from lungs of infected mice

Mice were euthanized at different times after infection and the lungs were removed. Lung tissue was then homogenized in 10 mL of PBS with 1 mg/mL collagenase (Roche, Mannheim, Germany). The cell suspension was incubated for 1 h at 37°C with occasional vortex agitation, and washed several times with sterile distilled water. The cells were suspended in sterile distilled water, and immediately placed in fixative for microscopy, in fresh medium for microscopy observation, or in Sabouraud agar at 30°C overnight to observe in vitro budding.

Microscopy techniques

Cells were viewed with different microscopes. In some experiments, an Olympus AX70 microscope was used and pictures were taken with a digital camera using QCapture Suite V2.46 software for Windows. Alternatively, a Leica DMI3000B connected to a DFC300 digital camera with LAS 3.3.1 software, or a Leica DMI 4000B or a Leica DMRD microscope connected to a Leica DC200 digital camera with IM1000 software were used. To visualize the size of the capsule, the cells were mixed with an India ink suspension. Digital images were processed with Adobe Photoshop 7.0 software (San Jose, CA). For confocal microscopy, a SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) was used.

Macrophage-like cell lines and cell culture techniques

The macrophage-like cell line RAW264.7 was maintained in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 10% NTCT, and 1% of non-essential amino acids at 37°C in the presence of a 5% CO₂ atmosphere.

Live-imaging of the interaction between macrophages and fungal cells

For phagocytosis experiments, 5×10^4 macrophages were placed on 96-well plates and incubated overnight at 37°C in the presence of 5% CO₂, so that a total number of 10^5 macrophages was expected after this incubation given a phagocytic cell replication time of approximately 12 h. Fungal cells were added at a 1:2 (macrophage:yeast cells) ratio in 200 µL of medium. Yeast cells of regular size were obtained by growing in Sabouraud medium overnight. To isolate giant cells, fungal cells were isolated from the lungs of infected mice as described above. Giant cells were separated from the rest of the fungal population by passing the sample through 11 µm filters. Although we defined giant cells as those larger than 30 µm (capsule included), we observed that the capsule did not contribute to retention on the filters, since the size of the cell delimited by the cell wall was the main factor associated with retention or passage. The filters containing the giant cells

were incubated in PBS with shaking for 20 minutes, and the cells were concentrated by centrifugation. After filtration, we observed that the population was significantly enriched in giant cells, being more than 90% of the sample. Finally, the cells that transited or were retained by the filter were counted using a haemocytometer.

Once regular and giant cells were obtained and exposed to the macrophages, the 96-wells plate was placed under a Leica DMI 4000B microscope using a 20× objective with a 5% CO₂ environment and 37°C. Pictures were taken at different time intervals (see figure legend of the corresponding supporting videos). The videos generated by the Leica software were exported as avi documents and processed with ImageJ (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) and Vid-Crop 2.1.0.0 (Geo Vid) softwares. The final videos were generated by merging 5 frames per second.

Melanin detection by immunofluorescence

Suspensions of cells isolated from mouse lung were air-dried on poly-L-lysine-coated slides (Sigma). The slides coated with the cells were washed in PBS, incubated in blocking buffer (Pierce, Rockford, IL) for 1 h at 37°C followed by incubation with 10 µg/ml of the IgM melanin-binding monoclonal antibody (mAb) 6D2 for 1 h at 37°C. MAb 6D2 was generated against melanin derived from *C. neoformans* [27]. After washing, the slides were incubated with a 1:1000 dilution of tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat anti-mouse (GAM) IgM (Southern Biotechnologies Associates, Inc; Birmingham, AL) for 1 h at 37°C. The slides were washed, mounted using a 50% glycerol, 50% PBS, and 0.1 M N-propyl gallate solution, and viewed with an Olympus AX70 microscope equipped with fluorescent filters. Negative controls consisted of cells incubated with mAb 5C11, which binds mycobacterial lipoarabinomannan [65], as the primary Ab or with TRITC-labeled Ab alone.

Scanning electron microscopy

Yeast cells were washed in PBS and suspended in fixing solution (2% p-formaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M sodium cacodylate buffer). Cells were then serially dehydrated with ethanol, coated with gold palladium and visualized using a JEOL (Tokyo, Japan) JAM 6400 microscope.

Transmission electron microscopy

Cells grown in vitro or isolated from the lungs of infected mice (see above) were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. The cells were treated with osmium tetroxide and serially dehydrated. The samples were embedded in epoxy resin and ultrathin sections were obtained, stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed in a CM12-Phillips transmission electron microscope.

DMSO and γ -radiation treatment

Yeast cells with enlarged capsule were exposed to varying amounts of γ -radiation from ¹³⁷Cs to remove layers of the polysaccharide capsule as described [29,66]. Briefly, giant and in vitro-grown cells were washed three times in PBS to remove shed capsular polysaccharides, suspended in 1 mL of distilled H₂O, and irradiated using a Shepherd Mark I Irradiator at the dose rate of 1388 rads/min. For all experiments, cells were irradiated for 40 minutes. Irradiated cells were collected by centrifugation. In other experiments, the fungal cells were suspended in DMSO as described in [29]. The presence of capsule after the treatments (γ -irradiation or DMSO) was visually observed by suspending the cells in India Ink and regular microscopy.

Complement labelling and detection

Complement (C3; complement protein 3) deposition on the cryptococcal capsule was performed as in [20]. Briefly, C57BL/6J mice were bled from the retro-orbital cavity and serum was obtained by centrifugation. Approximately 2×10⁷ cryptococcal cells were suspended in 700 µL freshly-obtained serum, and incubated at 37°C for 1 h. Cells were extensively washed and suspended in PBS. C3 was then detected using a fluorescein-isothiocyanate (FITC) conjugated GAM C3 antibody (4 µg/mL, Cappel, IGN, Aurora, OH). Yeast washed and not suspended in serum were used as controls. To delineate the capsular edge, mAb 18B7 (10 µg/mL) specific for GXM [67] was added, and detected using a TRITC conjugated GAM IgG1 antibody (10 µg/mL, Southern Biotechnology Associates, Inc). The cells were observed under fluorescent filters with the Olympus AX70 microscope, QCapture Suite V2.46 software for Windows, and Adobe Photoshop 7.0 for Macintosh.

Imaging of daughter cell emergence from the giant mother cells

Yeast cells were isolated from infected mice as described above, and placed on Sabouraud agar plates for 18 h 30°C. Initially, we tried recording the budding of giant cells by basic microscopy techniques, such as taking pictures every few minutes or seconds. However, the separation of the bud through the capsule of the giant cell was too fast, so we developed a new approach to record the phenomenon. The surface agar plate was observed with an Olympus AX70 microscope to visualize and continuously record giant cells. To record real-time daughter cell emergence, the cells were observed in the computer screen with the "Preview" option, and the image of the screen was recorded with a Digital Handycam Sony Camcorder affixed to a tripod. The videos were converted into digital files using Windows Movie Maker software provided by Microsoft Windows and processed with the Quick Media Converter (V. 3.6.5) software. Although this method provided lower resolution than the regular CCD used in microscopy, it permitted a precise measurement of the phenomenon.

XTT viability assay

Giant cells were obtained by filtering the yeasts obtained from the lung of infected mice through 22 µm filters. Then, the yeast cells were separated from the filter by gently shaking the filters in 20 mL of water in 50 mL centrifuge tubes. After 20 minutes, the filters were removed, and the tubes centrifuged at 2000 r.p.m. Then, the cells were suspended in 2 mL of sterile water and the cell concentration was estimated using a haemocytometer. Approximately 10⁵ giant cells were placed on 96 wells plates. In parallel, regular cells were obtained by overnight incubation in Sabouraud, washed with sterile water and counted with a haemocytometer. Then, the same number of cells (10⁵) was placed in 96-wells plates. As negative controls, equal numbers of giant and regular cells were heat-inactivated (45 minutes at 60°C) and placed in different wells of the 96-wells plates. Viability measurement based on the reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) by living cells was performed as described in [21] with minor modifications, which involved the use of 1 mg/mL of XTT and 25 µM menadione. Optical density at 450 nm was recorded every 30 minutes for 18 hours in a iEMS Spectrophotometer (ThermoFisher). Differences in metabolic activities were calculated by fold differences in the optical densities of the different wells.

Indirect immunofluorescence

To detect capsular features, we observed the immunofluorescence pattern after incubating the cells with the mAb 18B7 to the capsular polysaccharide as described above (see complement labelling and detection section), but using goat anti-mouse IgG1-FITC conjugated as the detection Ab. Yeast washed and incubated with the IgG1-FITC alone were used as controls. In some experiments, calcofluor (10 µg/mL) was included to visualize the cell wall.

Wheat germ agglutinin staining

To observe the presence of chitin-like structures, fungal cells with enlarged capsule (incubated in 10% Sabouraud in 50 mM MOPS buffer pH 7.3) were treated as in [33]. Briefly, the cells were washed with PBS and suspended in 4% p-formaldehyde cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) and incubated for 30 min at room temperature. The fixed cells were washed in PBS and suspended in 100 µL of a 5 µg/mL of WGA conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes, Invitrogen) for 1 hour at 37°C. Cell suspensions were mounted over glass slides and photographed with a Leica DMi 3000B fluorescence microscope.

Vacuole staining and visualization by confocal microscopy

To identify the vacuole in the yeast cells, we used the specific dye MDY-64 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon) following the manufacturer's recommendations. Briefly, the cells were suspended in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) supplemented with 5% glucose. MDY-64 was dissolved in DMSO, and added to 10^6 cells at a final concentration of 10 µM. The cells were incubated for 5 minutes at room temperature, and washed twice with the same buffer. The cells were observed with a SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

Cellular DNA content

Cells were isolated as described above and fixed by heating the cells at 60°C for 45 minutes in PBS buffer. Then, the cells were separated in two parallel samples, and propidium iodide was added to one of them at a final concentration of 10 µg/mL. DNA content was analyzed using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson). As a control, cells grown *in vitro* in Sabouraud medium were also analyzed.

Nuclear staining

To visualize the nucleus, the cells were treated with 3.7% formaldehyde for 30 minutes. Then, the cells were washed with PBS and DAPI was added at 0.3 µg/mL. The cells were incubated for 10 minutes at 37°C, and then washed twice with PBS. Finally, fluorescence was visualized in a Leica DM3000 microscope.

Real-time PCR

Giant cells were obtained by filtering the lung extracts through 22 µm filters as above. The filters were then placed in 50 mL tubes containing 20 mL of sterile water with moderate shaking, and after 20 minutes, the filters were removed. The tubes were centrifuged, and the pellet suspended in 0.5 mL of sterile water. Then, the cell concentration was determined using a haemocytometer. In parallel, cells obtained from a fresh liquid culture in Sabouraud were counted, and a cell suspension was prepared at the same concentration as that calculated for the giant cells. A real-time PCR using whole cells was then designed using equivalent numbers of the different cell types in the well. The reaction (final volume of 20 µL) contained 2.8×10^3 or 2.8×10^2

cells, 1.5 mM MgCl₂, and 0.8 µM of ITS1 (5'TCCGTAGGT-GAACCTGCGG3') and ITS2 (5'GCTGCGTTCTTCATC-GATGC3') oligonucleotides, which amplify the ITS1 region from the ribosomal DNA. The real time was performed using the SensiMix Kit (Quantance) using the enzymes and SYBR green concentrations recommended by the manufacturer. The reaction mix was placed in a 96-wells plate and PCR was performed in a LC480 real-time PCR machine (Roche). We included wells with a known concentration of *C. neoformans* genomic DNA (20, 2, 0.2 and 0.02 ng) to quantify the results. The PCR was performed according to the following protocol: initial step of 10 minutes at 95°C and 45 amplification cycles (10 seconds at 95°C, 5 seconds at 54°C and 30 seconds at 72°C). Once the PCR was finished, a standard curve was calculated using the wells of the known genomic DNA concentration, and this curve was used to calculate the estimate of DNA present in each of the samples.

Classification and Regression Trees (CART) analysis

The CART system was proposed by Breiman et al. [68], and is characterized by binary-split searches, automatic self-validation procedures and surrogate splitters. This analysis is used to find associations between events with statistical support. CART analysis (CART 6.0 Salford Systems, Ca., USA) was used to find associations between giant cell formation and inflammation in the lungs. This analysis was performed with the following methodological conditions, Gini method, minimum cost tree regardless of the size for selecting the best tree, 10 v-fold-cross-validation, equal priors, no costs, and no penalties. Relative error of 0 means no error or perfect fit, whereas 1 represents the performance of random guessing. The statistical support for this association is given by the ROC curve. In this graph, specificity (false positive rate) vs. sensitivity (true positives rate) is calculated, and the area under the curve is analysed. When this area is 1 (100% of sensitivity and 0% false positives), a total agreement for the prediction is obtained. An area of 0.5 or below is indicative of random guess.

Oxidative stress susceptibility

Yeast cells (regular and giant) were obtained as described above. The cells were incubated in PBS with or without 1 mM H₂O₂ at a cell density of 10^4 cells/mL. After two hours of incubation at 37°C, 100 µL of each sample was plated on Sabouraud agar medium. In addition, a 1/10 dilution was done in PBS, and 100 µL of this dilution was also plated. The plates were incubated at 30°C for 48 hours and the colonies were enumerated. The survival was expressed as the percentage of colonies counted in the samples incubated with H₂O₂ compared to colonies of control samples not exposed to the oxidative agent.

Statistical analysis

Normal distribution in group samples were assessed using the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests using Unistat 5.0 (Unistat Ltd, London, England) and Analyse-it (Analyse-it Ltd, Leeds, England) softwares for Excel. Statistical differences between groups were tested using Student's t-Test (normal distributions) or Kruskal-Wallis test (non-parametric test for non-normally distributed samples). Differences were considered significant when *p* value was below 0.05.

Ethics statement

All the experiments involving the use of animals have been performed following the guidelines of the Bioethical and Animal Welfare Committee of the Instituto de Salud Carlos III (approved protocol PA-349, to be performed at the National Centre for Microbiology).

Supporting Information

Video S1 Live imaging of giant cells budding in vitro. Giant cells were obtained from infected mice as described in Materials and Methods and in Figure 4 legend. Live imaging of budding was recorded and processed as described in Materials and Methods.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s001 (2.39 MB AVI)

Video S2 Live imaging of giant cells budding in vitro. Giant cells were obtained from infected mice as described in Materials and Methods and in Figure 4 legend. Live imaging of budding was recorded and processed as described in Materials and Methods.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s002 (0.18 MB WMV)

Video S3 Live imaging of giant cells budding in vitro. Giant cells were obtained from infected mice as described in Materials and Methods and in Figure 4 legend. Live imaging of budding was recorded and processed as described in Materials and Methods.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s003 (1.71 MB AVI)

Video S4 Live imaging of giant cells budding in vitro. Giant cells were obtained from infected mice as described in Materials and Methods and in Figure 4 legend. Live imaging of budding was recorded and processed as described in Materials and Methods.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s004 (2.94 MB AVI)

Video S5 Phagocytosis of *C. neoformans* by murine-like macrophages. The video shows the interaction of RAW264.7 macrophage cell lines exposed to *C. neoformans* H99 strain at a ratio 1:2. Videos were performed as described in Materials and Methods. Pictures were taken every 5 minutes, and 5 frames per second are shown in the video (1 second of the video is equivalent to 25 minutes of real time). A field of 100 μ m width is shown.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s005 (5.46 MB AVI)

Video S6 Macrophage fusion after *C. neoformans* phagocytosis and cell division. RAW264.7 macrophage cell lines were exposed to *C. neoformans* H99 strain at a ratio 1:2. Videos were performed as described in Materials and Methods. Pictures were taken every 5 minutes, and 5 frames per second are shown in the video (1 second of the video is equivalent to 25 minutes of real time). A field of 100 μ m width is shown.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s006 (6.16 MB AVI)

Video S7 *C. neoformans* intracellular replication. Macrophages and *C. neoformans* grown in Sabouraud were mixed as described in supplemental Videos S5 and S6. The pictures were taken every 2 minutes, and 5 frames per seconds are shown in the video (1 second of the video is equivalent to 10 minutes of real time).

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s007 (6.16 MB AVI)

Video S8 Interaction between giant cells and macrophages. Macrophages and *C. neoformans* giant cells were mixed at 1:2 ratio as described in Materials and Methods. Pictures were taken every 3 minutes, and 5 frames per second are shown in the video (1 second of the video is equivalent to 15 minutes of real time). A field of 100 μ m width is shown.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s008 (5.09 MB AVI)

Video S9 Interaction between giant cells and macrophages. Macrophages and *C. neoformans* giant cells were mixed at 1:2 ratio as described in Materials and Methods. Pictures and video were taken and assemble as described in Supporting Video S8. Scale bar denotes 50 μ m.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000945.s009 (2.04 MB WMV)

Acknowledgments

We thank Josefa Casas for her technical support, Laureano Cuevas and Esperanza Pérez Pastrana for their help obtaining the TEM images, Fernando Gonzalez from the Confocal Analytical Imaging Facility from the National Centre for Microbiology for his assistance with the confocal microscope, and Susana Sánchez for her help with the real-time PCR protocols. O.Z. warmly thanks his brother Rafael Zaragoza for his help in the final editing of some of the supporting videos shown in this article. J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella and O. Zaragoza belong to the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI, RD/06/008/0010). Finally, we would like to thank Drs. Kirsten Nielsen, Joe Heiman and Françoise Dromer for sharing with us their unpublished results about the formation of *C. neoformans* "giant cells" during murine infection.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OZ MCE JIRT AC. Performed the experiments: OZ RGR JDN. Analyzed the data: OZ JIRT AC. Contributed reagents/materials/analysis tools: AC. Wrote the paper: OZ JDN MCE JIRT AC.

References

- Casadevall A, Pirofski LA (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1: 17–24.
- Whiteway M, Badewich C (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 61: 529–553.
- Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 317–324.
- Liu H (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 4: 728–735.
- Maresca B, Kobayashi GS (1989) Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiol Rev* 53: 186–209.
- Kane J (1984) Conversion of *Blastomyces dermatitidis* to the yeast form at 37 degrees C and 26 degrees C. *J Clin Microbiol* 20: 594–596.
- Maresca B, Kobayashi GS (2000) Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib Microbiol* 5: 201–216.
- Park BI, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, et al. (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525–530.
- Casadevall A, Perfect JR (1998) *Cryptococcus neoformans*. Press A, ed. Washington DC: ASM Press.
- Cherniak R (1988) Soluble polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Curr Top Med Mycol* 2: 40–54.
- Goldman DL, Lee SC, Casadevall A (1995) Tissue localization of *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan in the presence and absence of specific antibody. *Infect Immun* 63: 3448–3453.
- Lee SC, Casadevall A, Dickson DW (1996) Immunohistochemical localization of capsular polysaccharide antigen in the central nervous system cells in cryptococcal meningitis. *Am J Pathol* 148: 1267–1274.
- Vecchiarelli A (2007) Fungal capsular polysaccharide and T-cell suppression: the hidden nature of poor immunogenicity. *Crit Rev Immunol* 27: 547–557.
- Yanch LE, Lam JS, Levitz SM (2006) Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog* 2: e120.
- Zaragoza O, Rodríguez ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, et al. (2009) The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133–236.
- McClelland EE, Bernhard P, Casadevall A (2006) Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun* 74: 1500–1504.
- Zaragoza O, Casadevall A (2004) Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* 6: 10–15.
- Feldmesser M, Kres V, Casadevall A (2001) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147: 2355–2365.
- Maxon ME, Cook E, Casadevall A, Zaragoza O (2007) The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol* 44: 180–186.
- Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A (2005) The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Euro J Immunol* 33: 1957–1967.

21. Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frares S, Casaccia-Estrella M, et al. (2008) Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* 10: 2043–2057.
22. Cruickshank JG, Cavill R, Jelbert M (1973) *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. *Appl Microbiol* 25: 309–312.
23. D'Souza CA, Alpaugh JA, Yue C, Harashina T, Cox GM, et al. (2001) Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 21: 3179–3191.
24. Love GL, Boyd GD, Greer DL (1985) Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol* 22: 1068–1070.
25. Zaragoza O, Mihu C, Casadevall A, Nosanchuk JD (2005) Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4358–4361.
26. Nosanchuk JD, Valdon P, Feldmesser M, Casadevall A (1999) Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. *Mol Cell Biol* 19: 745–750.
27. Rosas AL, Nosanchuk JD, Feldmesser M, Cox GM, McDade HC, et al. (2000) Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun* 68: 2845–2853.
28. Charles S, Frares S, Cammer M, Gerfen G, Casadevall A (2008) Growth and pigment production on Deryctophan medium by *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 46: 255–264.
29. Bryan RA, Zaragoza O, Zhang T, Ortiz G, Casadevall A, et al. (2005) Radiological studies reveal radial differences in the architecture of the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4: 465–475.
30. Dembitzer HM, Buzi I, Reis F (1972) Biological and electron microscopic changes in gamma irradiated *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl* 47: 307–315.
31. Gies MA, Thorskildsen P, Kozel TR (2004) Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* 52: 13–24.
32. Zaragoza O, Casadevall A (2006) Monoclonal antibodies can affect complement deposition on the capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* by both classical pathway activation and steric hindrance. *Cell Microbiol* 8: 1862–1876.
33. Rodrigues ML, Alvarez M, Fonseca FL, Casadevall A (2008) Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitin-like structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* 7: 602–609.
34. Zaragoza O, Telzak A, Bryan RA, Dadachova E, Casadevall A (2006) The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* 59: 67–83.
35. Miyaji M, Nishimura K, Ajello L (1985) Scanning electron microscope studies on the parasitic cycle of *Coccidioides immitis*. *Mycopathologia* 89: 51–57.
36. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000) *Atlas of Clinical Fungi*; de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ, eds. Utrecht, Reus: Centraalbureau voor Schimmel Cultures, Universitat Rovira i Virgili.
37. Alpaugh JA, Fukuda-Worley R, Harashina T, Cavallo LM, Funnell D, et al. (2002) Adenyl cyclase functions downstream of the G α protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 1: 75–84.
38. Alpaugh JA, Cavallo LM, Perfect JR, Heitman J (2000) RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 36: 352–365.
39. Alvarez M, Casadevall A (2006) Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16: 2161–2165.
40. Alvarez M, Casadevall A (2007) Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol* 8: 16.
41. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC (2007) Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunol* 8: 15.
42. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC (2006) Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 16: 2156–2160.
43. Luo Y, Alvarez M, Xia L, Casadevall A (2008) The outcome of phagocytic cell division with infectious cargo depends on single phagosome formation. *PLoS One* 3: e3219.
44. Cleare W, Casadevall A (1999) Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release. *Med Mycol* 37: 235–243.
45. Aldea M, Gari E, Colomina N (2007) Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle* 6: 2599–2603.
46. Sugimoto-Shinus K, Roberts K (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 6: 544–553.
47. Greben F, Dolz H, Beug H, Mullner EW (2005) Cell size control: new evidence for a general mechanism. *Cell Cycle* 4: 418–421.
48. Cavalier-Smith T (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J Cell Sci* 34: 247–278.
49. Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol* 3: 488–492.
50. Mendell JE, Clements KD, Chou JH, Augert ER (2008) Extreme polyploidy in a large bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6730–6734.
51. Megaert P, Uchiumi T, Alunni B, Easno G, Cheron A, et al. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5230–5235.
52. Shea JM, Kechichian TB, Luberto C, Del Poeta M (2006) The cryptococcal enzyme inositol phosphosphatidylphospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system. *Infect Immun* 74: 5977–5988.
53. Moyrand F, Fontaine T, Janbon G (2007) Systematic capsule gene disruption reveals the central role of galactose metabolism on *Cryptococcus neoformans* virulence. *Mol Microbiol* 64: 771–781.
54. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Christen F, et al. (2009) Evidence For A Role Of Monocytes In Dissemination And Brain Invasion By *Cryptococcus Neoformans*. *Infect Immun* 77: 120–127.
55. Kechichian TB, Shea J, Del Poeta M (2007) Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a *glucosylceramide*-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect Immun* 75: 4792–4798.
56. Shao X, Mednick A, Alvarez M, van Rooijen N, Casadevall A, et al. (2005) An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *J Immunol* 175: 3214–3221.
57. Zaragoza O, Alvarez M, Telzak A, Rivera J, Casadevall A (2007) The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect Immun* 75: 2729–2739.
58. Nosanchuk JD, Rosas AL, Lee SC, Casadevall A (2000) Melanization of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet* 355: 2049–2050.
59. Bonone EJ, Horga M, Abrams J (1999) “Giant” blastoconidia of *Candida albicans* morphologic presentation and concepts regarding their production. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34: 27–32.
60. Alasio TM, Lemmo PA, Bonone EJ (2003) Giant blastoconidia of *Candida albicans*. A case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 127: 868–871.
61. Perfect JR, Lang SDR, Durack DT (1980) Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol* 101: 177–194.
62. Kwon-Chung KJ (1976) Morphogenesis of *Blasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 68: 821–833.
63. Garcia-Rivera J, Eisenman HC, Nosanchuk JD, Aien P, Zaragoza O, et al. (2005) Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different lactose substrates. *Fungal Genet Biol* 42: 989–998.
64. Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A (2000) *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68: 4225–4237.
65. Glatman-Freedman A, Martin JM, Riska PF, Boom BR, Casadevall A (1996) Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 34: 2795–2802.
66. Maxson ME, Dadachova E, Casadevall A, Zaragoza O (2007) Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot Cell* 6: 95–109.
67. Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DI, et al. (1998) Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1437–1446.
68. Belman L, Friedman JH, Olshen JH, Stone CG (1984) Classification and regression trees. Belmont: Wadsworth International.

The Interaction between *Candida krusei* and Murine Macrophages Results in Multiple Outcomes, Including Intracellular Survival and Escape from Killing^{▽†‡}

Rocío García-Rodas,¹ Fernando González-Camacho,² Juan Luis Rodríguez-Tudela,¹ Manuel Cuenca-Estrella,¹ and Oscar Zaragoza^{1*}

Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, Km2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain,¹ and Confocal Microscopy Facility, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, Km2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain²

Received 12 January 2011/Returned for modification 7 February 2011/Accepted 10 March 2011

Candida krusei is a fungal pathogen of interest for the scientific community for its intrinsic resistance to fluconazole. Little is known about the interaction of this yeast with host immune cells. In this work, we have characterized the outcome of the interaction between *C. krusei* and murine macrophages. Once *C. krusei* was internalized, we observed different phenomena. In a macrophage-like cell line, *C. krusei* survived in a significant number of macrophages and induced filamentation and macrophage explosion. Phagocytosis of *C. krusei* led to actin polymerization around the yeast cells at the site of entry. Fluorescent specific staining with anti-Lamp1 and LysoTracker indicated that after fungal internalization, there was a phagolysosome maturation defect, a phenomenon that was more efficient when the macrophages phagocytosed killed yeast cells. Using cell line macrophages, we also observed macrophage fusion after cell division. When we used primary resident peritoneal macrophages in addition to macrophage explosion, we also observed a strong chemotaxis of uninfected macrophages to regions where *C. krusei*-infected macrophages were present. We also noticed yeast transfer phenomena between infected macrophages. Primary macrophages inhibited pseudohypha elongation more efficiently than the macrophage-like cell line, suggesting that *C. krusei* infection was better controlled by the former macrophages. Primary macrophages induced more tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) than the macrophage-like cell line. Our results demonstrate that *C. krusei* can exploit the macrophages for replication, although other different outcomes are also possible, indicating that the interaction of this pathogen with phagocytic cells is very complex and regulated by multiple factors.

Fungal pathogens have arisen as a global threat to the health of immunocompromised patients. The management of these patients is complicated, due to their strong immunosuppression and to the fact that factors from both the pathogen and the host can contribute to the damage produced during infection (4).

Phagocytosis plays an important role in the host defense (see the review in reference 24). However, many pathogens have developed pathways to evade killing once they have been phagocytosed (see the review in reference 3). Moreover, some of these pathogens exploit the intracellular environment to replicate inside the macrophage and disseminate through the organism, the so-called Trojan horse model (5, 6, 21). This may offer a potential explanation for those pathogens which stay latent and spread within the host without triggering an immediate immune response. This mechanism has been shown for several fungal pathogens, in particular for *Histoplasma capsulatum* (7) and *Cryptococcus neoformans* (5). In addition, the

activity of macrophages against some infections might determine the susceptibility of the host to that particular pathogen (28).

Candida krusei is a fungal pathogen that has been described in healthy hosts as an infrequent isolate of minor clinical significance inhabiting the mucosal surfaces (25). However, it is a pathogen of concern among immunocompromised patients, causing fungemia, endophthalmitis, arthritis, and endocarditis (12, 19). The widespread use of fluconazole to treat fungal infections has contributed to the appearance of *C. krusei* infections, since this species shows intrinsic resistance to this antifungal (22). *Candida krusei* can form pseudohyphae (11), a feature that might contribute to its virulence (26). Different studies have shown that *C. krusei* is less virulent than *Candida albicans* in terms of its adherence to epithelial cells and prosthetic devices, proteolytic potential, and production of phospholipases (10). Furthermore, *C. krusei* is different from other *Candida* spp. in its structural and metabolic features and exhibits different behavior patterns toward host defenses (25). Few studies have been conducted to determine the potential virulence of *C. krusei* in humans and laboratory animals. It is already known that *C. krusei* is less invasive than *C. albicans*, although it shows a heavy growth on the superficial epithelium (27). Besides this, *C. krusei* has been demonstrated to be more hydrophobic than other species of *Candida*, and this could play a critical role in the colonization of medical devices such as implants and catheters to which *C. krusei* has been shown to be

* Corresponding author. Mailing address: Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, Km2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain. Phone: (34) 91 822 36 61. Fax: (34) 91 509 70 34. E-mail: ozaragoza@isci.es.

† This article is dedicated to the memory of Professor Jose Pontón, friend and great scientist, who will never be forgotten.

‡ Supplemental material for this article may be found at <http://iai.asm.org/>.

▽ Published ahead of print on 21 March 2011.

more adherent (27). The ability to produce hydrolytic enzymes is considered a putative virulence factor of *Candida* spp. However, *C. krusei* does not produce these enzymes (25). These findings suggest that the virulence attributes of *C. krusei* could be more related to the host immune state than to specific fungal features.

In this work, we examined the intracellular behavior of this fungal pathogen once it has been phagocytosed by macrophages. We found that the interaction between macrophages and *C. krusei* is very complex and that multiple outcomes are possible, such as macrophage explosion, yeast expulsion, yeast transfer between macrophages, and macrophage fusion after division. Our findings indicate new aspects of *C. krusei* involved in the virulence of this organism.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and growth conditions. *Candida krusei* ATCC 6258 was cultured in liquid Sabouraud medium for 24 h at 30°C with moderate shaking (150 rpm) prior to experimental use.

Murine macrophage-like cells and culture conditions. The adherent macrophage-like cell line RAW 264.7 was used for experimental work (23). This cell line is derived from the ascites of a tumor induced in a male mouse by intraperitoneal injection of Abelson murine leukemia virus (A-MuLV).

The cells were grown in feeding medium, which contained Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; HyClone-Perbio), 10% NCTC medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and 1% nonessential amino acids (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The cells were regularly maintained at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere.

Isolation of primary macrophages. Primary macrophages were isolated from the peritoneal cavities of C57BL/6J mice (male, 8 to 12 weeks old) by washing the peritoneal cavities with phosphate-buffered saline (PBS), following the guidelines provided by the Committee for Bioethics and Animal Welfare from the Instituto de Salud Carlos III (approved protocol PA349). After centrifugation of the cell suspension, primary macrophages were counted using a hemocytometer. A suspension of 5×10^5 cells/ml in feeding medium was prepared, and 200 µl per well was added to 96-well tissue culture plates the day before the phagocytosis assays were performed.

Phagocytosis assays. Phagocytosis assays were performed as described in reference 34. Briefly, RAW 264.7 macrophages were separated from tissue culture plates by continuing pipetting. The cells were centrifuged at $170 \times g$ (1,000 rpm), and the pellet was suspended in 2 ml of fresh feeding medium. The cell density was estimated using a hemocytometer. A suspension of 2.5×10^5 cells/ml was prepared, and 200 µl per well was added (5×10^4 macrophages per well) to 96-well tissue culture plates (Costar, NY). For each condition, three wells were carried out in parallel. The plate was incubated overnight at 37°C in the presence of 5% CO₂. Since these cells divide once during the night, it was estimated that 10^5 macrophage-like cells were present in each well at the moment they were exposed to the yeast cells. When primary macrophages were used, the cells obtained from the peritoneal cavity were directly placed on 96-well plates as described above and incubated overnight at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere. Then, the medium was removed, and 200 µl of fresh feeding medium containing *C. krusei* at a cell density of 10^6 cells/ml or 5×10^5 cells/ml was added to each well. As a result, a 1:2 or 1:1 macrophage:yeast ratio was used in the macrophage-like cell line or the primary peritoneal macrophages, respectively. The phagocytosis was carried out for 2 h at 37°C in the presence of 5% CO₂. Then, the wells were washed 5 times with feeding medium to remove the non-phagocytosed yeasts, and fresh feeding medium was added to the wells. Furthermore, phagocytosis assays were also performed using heat-killed *C. krusei* with both the macrophage-like cell line and primary macrophages.

Time-lapse recording and video processing. The 96-well plate was placed under a Leica DMI 4000B microscope using a 20× lens objective in a 5% CO₂ environment at 37°C. Pictures were taken every 3 min for around 18 h. The videos generated by the Leica software were exported as AVI documents and processed with ImageJ software (NIH) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The final videos were generated by merging 8 frames per second, with each frame taken every 3 min, which means that a second from the video is equivalent to 24 min of the experiment.

Phagocytosis staining and quantification. To quantify the phagocytosis, Giemsa staining was performed as described in reference 34. After phagocytosis, the medium was removed, and 100 µl of ice-cold methanol was added to each well. After 30 min of incubation at room temperature, methanol was removed, and the wells were washed 3 times with 200 µl of PBS. A 1:20 dilution of Giemsa stain (Merck) was added to each well for 30 min. Then, Giemsa staining solution was removed, and 100 µl of PBS was added to each well. Using a Leica DMI 3000B microscope, 5 pictures per well were taken to count the total number of macrophages and the number of macrophages with intracellular yeast. The phagocytosis percentage was calculated as (the number of infected macrophages/the number of total macrophages) $\times 100$.

Intracellular/extracellular pseudohypha formation. To test if the macrophage-like cell line or primary macrophages had different effects on pseudohypha formation, the following protocol was designed. Phagocytosis was carried out for 5 h as described above using a 1:1 macrophage/*C. krusei* cell ratio, and noninternalized yeast cells were isolated by gently washing the well twice with PBS. Five pictures per well were taken of these noninternalized cells to count the number of blastoconidia forming the pseudohyphae and to measure their length. To observe the yeasts internalized in the macrophages, the wells were washed again with PBS, and 100 µl of distilled water per well was added to produce the macrophage explosion. After 30 min of incubation at 37°C, we collected the medium from the wells and observed it under the microscope. Parallel samples of yeast cells incubated in feeding medium without macrophages were carried out as controls. The number of blastoconidia forming the pseudohyphae and their total length were calculated. The results were analyzed using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.) and PASW Statistics 17 software (SPSS SL).

Actin staining with fluorescent labeled phalloidin. Macrophages were grown on poly-L-lysine-pretreated coverslips in cell culture plates (BD, France). The final macrophage density was 5×10^6 macrophages/ml. The *C. krusei* inoculum was prepared at 1.5×10^7 cells/ml and stained with 10 µg/ml calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO) for 10 min at 37°C. Then, the inoculum was washed twice with sterile PBS and added to the coverslips. Phagocytosis, as described above and in the dark, was performed for 1 h, and then coverslips were washed three times to eliminate the nonphagocytosed yeasts. Cells were fixed with freshly prepared 4% *p*-formaldehyde for 10 min and washed with PBS. Coverslips were incubated with 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) for 5 min and washed again with PBS. Cells were incubated with 0.33 µM fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated phalloidin solution (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon) for 20 min and washed with PBS. Coverslips were placed on slides with Fluoromount-G (SouthernBiotech), and pictures were taken with an SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). Three-dimensional videos were generated from the confocal pictures using Vox software (Indiana University), as previously described (18).

Immunofluorescence staining for lysosomal membrane protein LAMP1. *Candida krusei* inoculum prepared at 1.5×10^7 cells/ml was stained with 10 µg/ml of calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO), and phagocytosis using a 1:3 macrophage/*C. krusei* cell ratio was performed as described above. Cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde for 10 min and washed with PBS. Coverslips were incubated with 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) for 5 min and washed again with PBS. Cells were incubated in 1% PBS-bovine serum albumin (BSA) for 15 min, and a 2.5-µg/ml solution of anti-Lamp1-biotin antibody (eBioscience) was added for 1 h. After incubation, coverslips were washed with PBS, and a 1 µg/ml solution of Streptavidin-Alexa 568 (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon) was added for 30 min. Then, coverslips were washed again and placed on slides with Fluoromount-G (SouthernBiotech). Finally, fluorescence was visualized using confocal microscopy, as described above.

Assessment of phagolysosome acidification. Phagocytosis was performed at different times (30 min and 2 h), and nonphagocytosed yeast cells were removed by washing them with sterile PBS. LysoTracker red DND-99 (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon) was added to the culture medium at a final concentration of 0.05 µM for 2 h at 37°C with 5% CO₂. Parallel samples using heat-killed cells were carried out as positive controls. Coverslips were washed with PBS and mounted on slides with Fluoromount-G, and pictures were taken with a confocal microscope. To determine the acidification of the phagolysosomes, we examined the colocalization of LysoTracker red with *C. krusei* cells stained with calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO). To establish statistical differences between live and heat-killed yeast cells, the experiments were performed in triplicate, and a *t* test was used to determine the *P* value.

Cytokine quantification produced by primary and RAW 264.7 macrophages in the presence of *C. krusei*. Phagocytosis was carried out for 2 h as described above using a 2:1 macrophage/*C. krusei* cell ratio with both primary macrophages and RAW 264.7 macrophages. Supernatant was removed, fresh medium was added, and plates were incubated at 37°C with 5% CO₂. Supernatants were collected

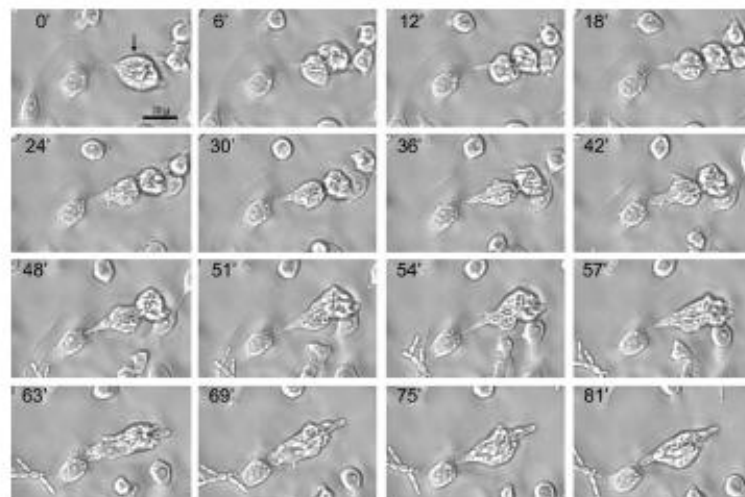


FIG. 1. Division and fusion of macrophage-like RAW 264.7 cells. The sequence of images shows division of an infected macrophage (black arrow). After cell division, a fungal pseudohypha is trapped between both of the daughter macrophage cells. As a result, the macrophages fuse, and *C. krusei* continues intracellular proliferation. The scale bar shown in the first picture applies to all the panels. The time lapse between selected pictures is 3 or 6 min, as indicated in each panel.

after 4 h and an overnight incubation, and they were kept at -20°C after being centrifuged to discard residual macrophages and yeast cells. The experiment was performed in triplicate. The supernatants were analyzed following use of the cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences) using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed with FACSArray software.

Statistics. To assess statistical differences, the *t* test was performed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Differences were considered significant when *P* values were ≤ 0.05 .

RESULTS

Interaction of *C. krusei* with macrophage-like cell line RAW 264.7. We first performed phagocytosis assays as described in Materials and Methods using the macrophage-like cell line RAW 264.7. These macrophages had phagocytic activity in the presence of *Candida krusei*, and some macrophages were able to phagocytose not only blastoconidia but also pseudohyphae of a size similar to that of the macrophages (see Video S1 in the supplemental material). To quantify the phagocytosis, we stained the cells with Giemsa and found that around 10 to 20% of the macrophages had ingested *C. krusei* cells after 2 h without any opsonin added.

To study the intracellular behavior of *C. krusei*, we extensively washed the wells to remove the nonphagocytosed yeast cells after 2 h of phagocytosis. Then, the infected macrophages were observed using time-lapse microscopy. We observed that *C. krusei* survived inside the macrophages and induced pseudohypha formation (see Videos S1 and S2 in the supplemental material). This phenomenon occurred in 85% of the infected macrophages. The intracellular growth of the fungus yielded macrophage explosion (see Videos S1 and S2). During the overnight incubation, macrophages divided, but in the case of infected macrophages, we frequently observed that nascent macrophages fused after division, yielding a macrophage of a

larger size (Fig. 1). This phenomenon was also observed when heat-killed yeast cells were used (result not shown). In some cases, *C. krusei* cells were not properly distributed among the two nascent macrophages, and prior to the fusion, pseudohypha sharing by both nascent macrophages was observed (Fig. 1; see also Video S1 in the supplemental material).

Internalization of *C. krusei* by macrophage-like RAW 264.7 cells is associated with actin rearrangements. Phagocytosis of *C. krusei* led to the polymerization of actin around the yeast cells at the site of entry. Using fluorescent phalloidin, we observed a bright ring around the ingested yeast cells (Fig. 2; see also Videos S3 and S4 in the supplemental material). In contrast, a diffuse fluorescence was observed when macrophages had no internalized *C. krusei* cells (Fig. 2).

***Candida krusei* induces phagolysosome maturation defects in RAW 264.7 cells.** To investigate the mechanism by which *C. krusei* evaded killing after phagocytosis, we studied the phagolysosome maturation by using Lamp1 localization and analyzing the acidification of the phagolysosome using the LysoTracker red probe. In most of the macrophages, Lamp1 did not colocalize with the yeast cells, and colocalization was observed in only 20% of the macrophages (Fig. 3A shows representative images for these two situations). In agreement with this finding, we also found that acidification of the phagosomes in which *C. krusei* was observed was a rare phenomenon, and in the majority of the macrophages, there was not a colocalization between LysoTracker red and *C. krusei* cells. In Fig. 3B, we show an example of macrophages exhibiting the two patterns (colocalization or absence of colocalization). Since phagosome acidification is the final step of phagosome maturation, we carefully quantified the phenomenon at two different time points, 30 min (early time point) and 2 h (late time

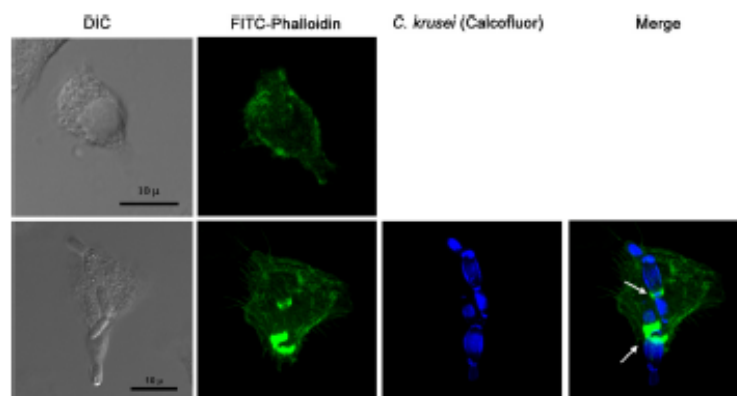


FIG. 2. Actin staining in RAW 264.7 macrophages infected with *C. krusei*. Actin staining of uninfected (top row) and infected (bottom row) macrophages using FITC-labeled phalloidin. *C. krusei* cells were stained with calcofluor white (in blue). Actin rearrangements are pointed out with white arrows. DIC, differential interference contrast.

point). As shown in Fig. 3C, there was a low proportion of macrophages in which acidification of phagosomes containing *C. krusei* cells was observed, suggesting that *C. krusei* inhibits phagolysosome maturation. Previous findings in *Candida albicans* suggest that inhibition of phagolysosome maturation requires living cells (17), so we performed the same experiment but used heat-killed yeasts. As shown in Fig. 3C, phagosome acidification was observed in a higher proportion of macrophages, compared to the situation found with live yeast cells. These data indicate that *C. krusei* actively inhibits phagosome maturation and provide a mechanism for intracellular survival.

Interaction of *C. krusei* with primary peritoneal macrophages. To confirm our results in a nonmodified phagocyte, we investigated the behavior of *C. krusei* in primary resident peritoneal murine macrophages obtained from the peritoneal cavities of C57BL/6J mice. These macrophages were less adherent than the RAW 264.7 cells. For this reason, removal of noninternalized yeasts produced a marked reduction in the number of macrophages adhered to the plate. To avoid this issue, we preferred to use a 1:1 macrophage/yeast cell ratio when working with primary macrophages rather than the 1:2 ratio used with RAW 264.7 cells, so elimination of noningested yeast did not require extensive washes of the well. The phagocytosis percentage was also around 20%, and similar to the situation found with the macrophage-like cell line, we observed pseudohypha formation and macrophage explosion after internalization of the yeast cells, confirming that *C. krusei* can survive inside phagocytic cells. However, this phenomenon occurred less frequently than that in the RAW 264.7 cells, and it was found in around 50% of the infected primary macrophages.

In addition to intracellular survival, we also observed other different phenomena. Primary resident macrophages exhibited a strong chemotactic effect, in which macrophages migrated to regions where other infected macrophages or *C. krusei* cells were present (see Video S5 in the supplemental material). This phenomenon was found to be more noticeable when infected macrophages exploded and *C. krusei* cells were released and

was significantly decreased when using heat-killed yeast cells (result not shown).

We also observed that infected macrophages extruded *C. krusei* cells, a phenomenon that did not have an effect on the integrity of the macrophage (Fig. 4A; see also Video S6 in the supplemental material). In some cases, these yeasts that were extruded from macrophages were engulfed by surrounding macrophages (see Video S5). More striking, we occasionally found that an infected macrophage was able to transfer intracellular yeast cells to another macrophage (Fig. 4B; see also Video S7). In these cases, there was a partial fusion of the cell membranes of the donor and recipient macrophages. In addition, previous to the transfer, the recipient macrophage formed an intracellular compartment. After the membrane fusion, the yeasts were transferred to this last compartment in the recipient macrophage (Fig. 4B; see also Video S7). Although *C. krusei* survived in a significant number of infected primary macrophages, we also observed that these macrophages were able to “destroy” the yeast cells. In these cases, intracellular yeast cells lost their visual integrity, which was accompanied by the appearance of small vesicles in the macrophage (see Video S8).

Pseudohypha formation during phagocytosis. When phagocytosis was performed with the macrophage-like cell line and primary macrophages, we observed differences in the outcome of the interaction, which suggested that primary macrophages had a stronger antifungal effect. In consequence, we investigated if these two types of macrophages had different effects on pseudohypha formation. *Candida krusei* induced pseudohypha elongation in feeding medium, which was registered by the appearance of new blastoconidia (4 to 5, compared to 2 at time zero) (Fig. 5A). When the yeast cells were incubated in the presence of the macrophage-like cell line RAW 264.7, the yeast produced pseudohyphae as the control, independently of whether they were found inside or outside macrophages. In contrast, when *C. krusei* cells were incubated with primary resident macrophages, we noticed that the pseudohyphae were composed of a lower number of blastoconidia (Fig. 5B and C).

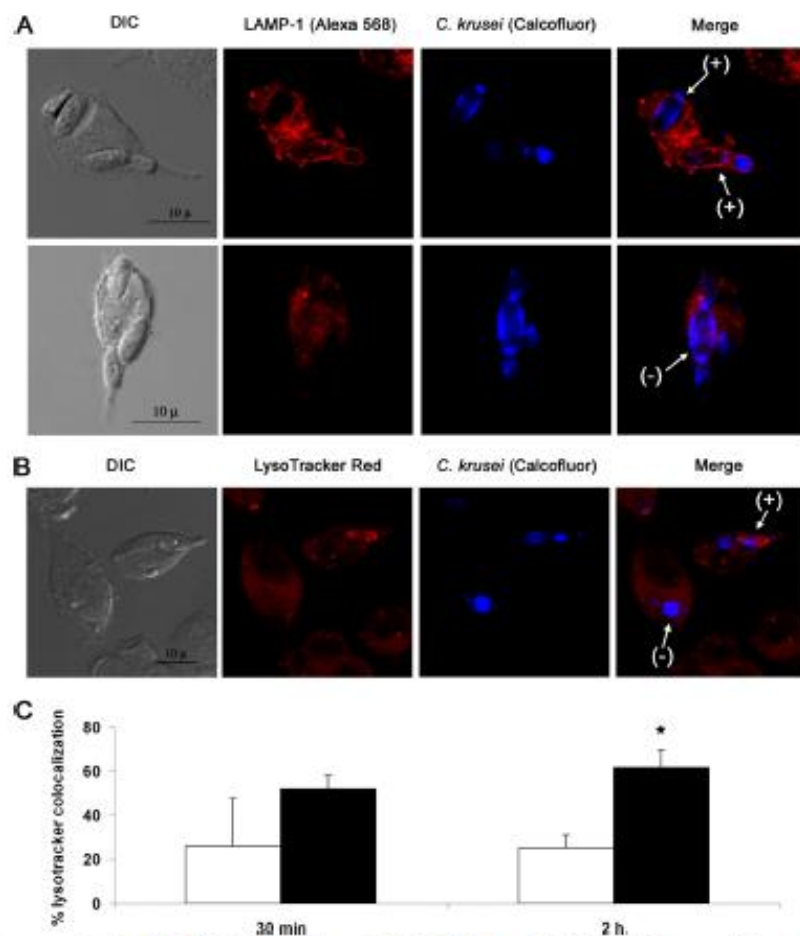


FIG. 3. Phagosome maturation in RAW 264.7 macrophages infected with *C. krusei*. (A) Confocal microscopy of Lamp1 localization (red fluorescence) in macrophages with *C. krusei* cells (blue fluorescence) internalized after 1 h of phagocytosis. Arrows indicate positive (+; top row) and negative (-; bottom row) colocalization of Lamp1 with *C. krusei*. The scale bar shown in the first panel applies to the rest of the panels in the same row. (B) LysoTracker red localization in infected macrophages by confocal microscopy. *C. krusei* was stained with calcofluor white. Arrows indicate positive and negative colocalization of the dye with the yeast cells. The scale bar shown in the first panel applies to the rest of the panels in the same row. (C) The colocalization of *C. krusei* and the dye was measured by fluorescent microscopy after 30 min and 2 h of phagocytosis. The experiment was performed in triplicate, and the average values and standard deviations were plotted in the bar graphs. Black bars represent colocalization of heat-killed *C. krusei* and LysoTracker, while white bars represent colocalization of live yeast cells and the fluorescent dye. The asterisk denotes statistical difference ($P < 0.05$).

This difference was observed in both intracellular and extracellular yeast cells. These results were also confirmed by measuring the total length of the pseudohyphae (Fig. 5B and C).

Pattern of cytokine production after *C. krusei* phagocytosis. Our previous findings indicate that the interaction between *C. krusei* and phagocytic cells is different, depending on whether macrophage-like cells or primary macrophages were used. Since macrophage activation is an important step to determine the antimicrobial activity of the phagocytic cells, we investigated if the

macrophage-like cell line RAW 264.7 and primary macrophages produced different cytokines after challenge with *C. krusei*. Primary macrophages produced higher levels of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF- α) both at 4 h and after overnight incubation. As a consequence, primary macrophages accumulated interleukin-6 (IL-6), a cytokine not detected in the supernatants of the infected macrophage-like cell line. Moreover, IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was produced at higher levels by RAW 264.7 macrophages (Fig. 6).

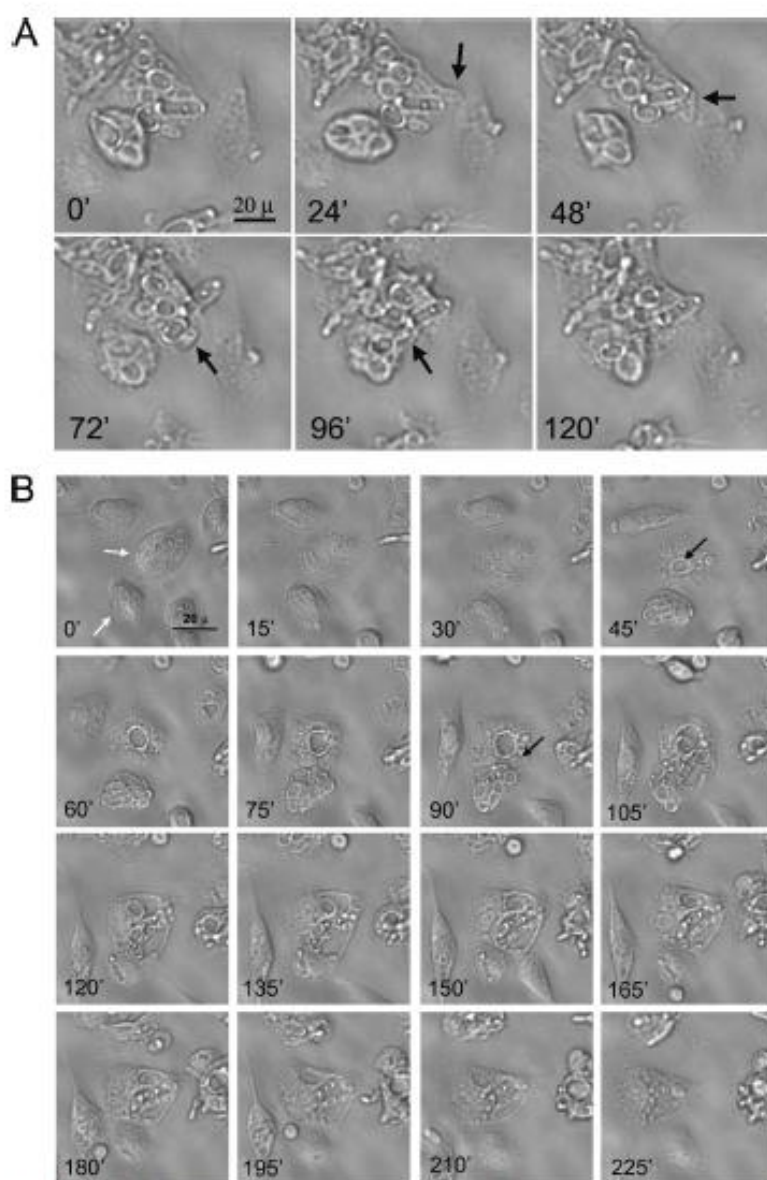


FIG. 4. Extrusion of blastoconidia and yeast transfer between infected primary macrophages. (A) Expulsion of yeast cells from primary macrophages. Black arrows indicate yeast cells expelled by the macrophage. The time lapse between pictures is 18 min. The scale bar shown in the first picture applies to the rest of the pictures. (B) Yeast transfer between primary macrophages. Two infected macrophages (white arrows) fuse, and yeast blastoconidia are transferred from the lower macrophage to the upper one. Prior to the transfer, an intracellular compartment appears in the recipient macrophage (black arrows in panels corresponding to 45 and 90 min), compartments in which the yeast cells will be located after the transfer. The scale bar shown in the first picture applies to the rest of the pictures. The time lapse between selected pictures is 15 min.

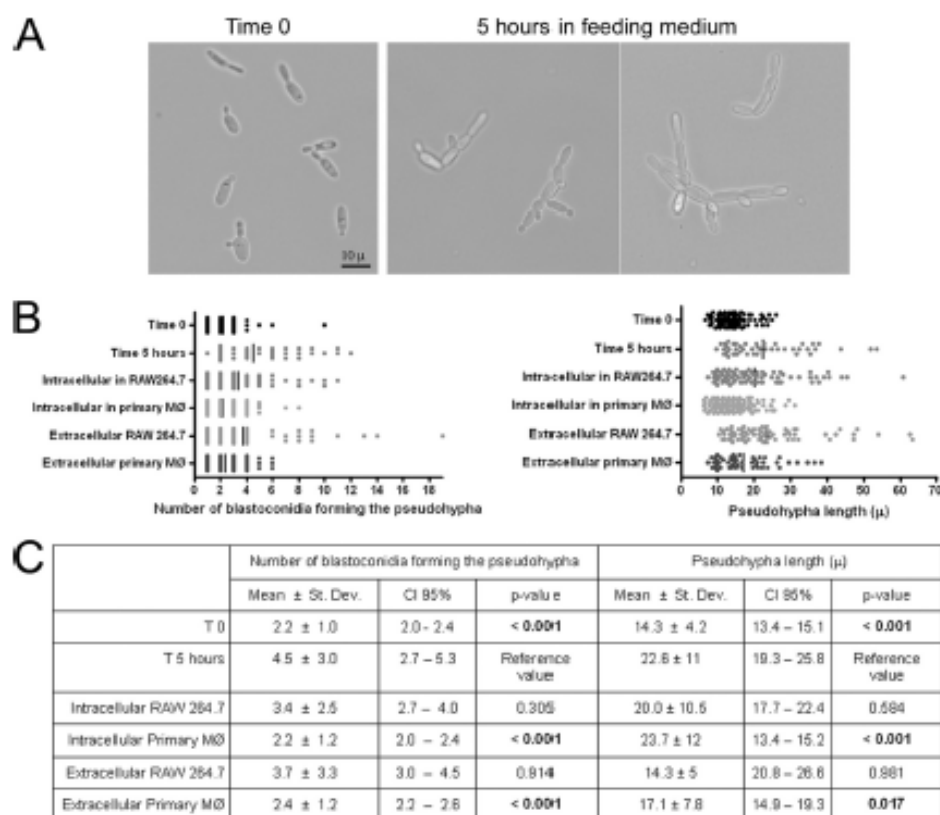


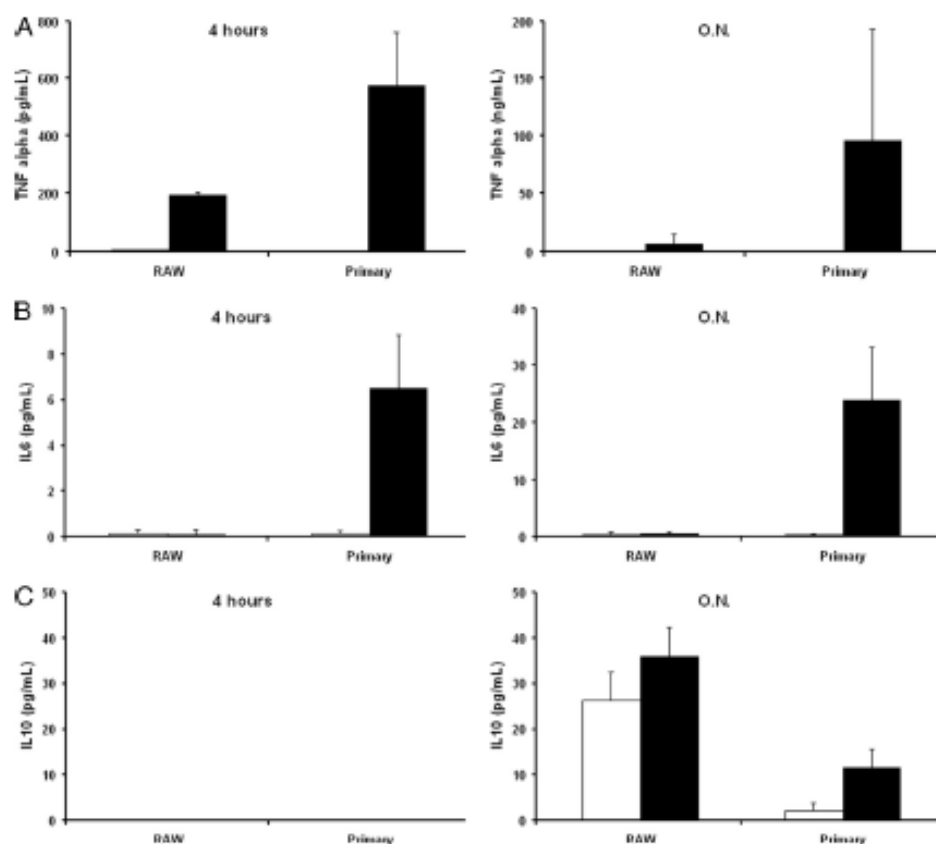
FIG. 5. Pseudohypha formation after phagocytosis. (A) Images of *C. krusei* at time zero and after 5 h of incubation in feeding medium during the phagocytosis assay. (B) Graphic showing a distribution of the number of blastoconidia forming the pseudohypha and its length under all the experimental conditions. (C) Table showing the mean number of blastoconidia forming the pseudohypha and the length of the pseudohypha. The *P* value resulting from the Student *t* analysis considering the value obtained for the control yeast cells incubated for 5 h in feeding medium as a reference value for all the comparisons is shown. Statistical differences of these comparisons are highlighted in boldface.

DISCUSSION

The capacity for intracellular pathogenesis is an important feature because the outcome of interaction of macrophages with fungal pathogens might determine the susceptibility of the host to the infection (28, 32). In this work, we demonstrate that the emerging fungal pathogen *Candida krusei* can survive and exploit the intracellular macrophage environment for its replication, which may influence the dissemination through the organism. The mechanisms involved in intracellular pathogenesis are diverse. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagosome-lysosome fusion (20), and this mechanism allows a latent infection in the host that can last years. Among fungi, the best-characterized intracellular pathogen is *Histoplasma capsulatum*, which impairs phagosome-lysosome fusion (7, 29). Another well-known example is *Cryptococcus neoformans*. This encapsulated yeast has developed different mechanisms to evade killing by the macrophages, including formation of leaky phagolysosomes (30) and induction of capsule enlargement,

which confers protection to free radicals (33). In the case of *C. krusei*, we have observed that there is a defect in the maturation of the phagolysosome by using different markers of this process, such as Lamp1 and LysoTracker. This finding is in agreement with the related species *Candida albicans*, for which a reduction of phagosome maturation and acidification defects have been described (8, 17). Similar findings have been found in the survival of *Candida albicans* inside epithelial cells (35).

One striking aspect of our work is the number of possible outcomes for the interaction between this fungus and the macrophages. For example, in macrophage-like cell lines, we observed macrophage fusion after cell division. Although we did not observe this phenomenon in primary macrophages because they do not divide, we observed a strong chemotactic effect of the macrophages on the areas where *C. krusei* was present. These findings suggest that the host immune system has developed mechanisms to control the intracellular parasitism by producing a more effective cellular response. This response was decreased when macro-



observed might be related to the activation state of the phagocytes. In addition, our findings highlight that macrophage-like cell lines might have partially lost their antimicrobial activity, which raises a note of warning in the interpretation of data exclusively obtained with these cell types. Our work also demonstrates that even when using the same type of macrophages, the population is not homogenous, and multiple phenomena are observed in the same experiment, which suggests that the interaction depends on individual traits, such as the activation state of each macrophage. In this context, it has been shown that the cell cycle and postmitotic events might influence the outcome of the interaction (13, 14), which highlights a feature that could partially explain the different behavior of each macrophage in the well. In addition, the specific production of cytokines by a certain macrophage could influence the behavior of the surrounding macrophages. In this sense, it has been shown that the intracellular parasitism of *Cryptococcus neoformans* can be modulated by the addition of different cytokines, and in particular, induction of Th1 and Th17 responses in the macrophage produces a reduction in the capacity of intracellular replication of this fungus (31).

In conclusion, our results demonstrate that *C. krusei* can evade killing by macrophages. This finding had not been previously described and highlights a new mechanism by which this pathogen can survive and disseminate in the host. We also describe other processes developed by the macrophage (such as macrophage fusion, chemotaxis, or yeast cell transfer between phagocytic cells) that might reflect mechanisms developed by the immune system to control the infection. We argue that the balance between these processes is important to determine the development of the infection, and for this reason, we believe that our results could have profound implications on the understanding of *C. krusei* pathogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

R.G.-R. is supported by a FPI fellowship (reference BES-2009-015913) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. O.Z. is funded by grants SAI-2008-03761 and PCI2006-a7-0606 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

We thank David Martín from Leica Microsystems for technical assistance with the time-lapse microscopy and Enrique Viguera for providing the animals used in this study.

REFERENCES

- Alvarez, M., and A. Casadevall. 2007. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol.* 8:16.
- Alvarez, M., and A. Casadevall. 2006. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr. Biol.* 16:2161–2165.
- Bliska, J. B., and A. Casadevall. 2009. Intracellular pathogenic bacteria and fungi—a case of convergent evolution? *Nat. Rev. Microbiol.* 7:165–171.
- Casadevall, A., and L. A. Pirofski. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:17–24.
- Chartier, C., et al. 2009. Evidence for a role of monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77:120–127.
- Drevets, D. A., et al. 2004. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J. Immunol.* 172:4418–4424.
- Eisenberg, L. G., W. E. Goldman, and P. H. Schlesinger. 1993. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J. Exp. Med.* 177:1605–1611.
- Fernández-Arenas, E., et al. 2009. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell. Microbiol.* 11:560–589.
- Reference deleted.
- Horn, D. L., et al. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 48:1695–1703.
- Kurtzman, C. P., and J. W. Fell (ed.). 1997. *The yeasts: a taxonomical study*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Lewis, R. E. 2009. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr. Med. Res. Opin.* 25:1732–1740.
- Luo, Y., M. Alvarez, L. Xia, and A. Casadevall. 2008. The outcome of phagocytic cell division with infectious cargo depends on single phagosome formation. *PLoS One* 3:e3219.
- Luo, Y., S. C. Tucker, and A. Casadevall. 2005. Fc- and complement-receptor activation stimulates cell cycle progression of macrophage cells from G1 to S. *J. Immunol.* 174:7226–7233.
- Ma, H., J. E. Croudace, D. A. Lammas, and R. C. May. 2007. Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunol.* 8:15.
- Ma, H., J. E. Croudace, D. A. Lammas, and R. C. May. 2006. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr. Biol.* 16:2156–2160.
- Marcell, A., et al. 2008. Analysis of PRA1 and its relationship to *Candida albicans*-macrophage interactions. *Infect. Immun.* 76:4345–4358.
- Maxson, M. E., E. Dadachova, A. Casadevall, and O. Zaragoza. 2007. Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot. Cell* 6:95–109.
- Merz, W. G., J. E. Karp, D. Schron, and R. Saral. 1986. Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. *J. Clin. Microbiol.* 24:581–584.
- Nguyen, L., and J. Pieters. 2005. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 15:269–276.
- Peluso, R., A. Haase, L. Stowring, M. Edwards, and P. Ventura. 1985. A Trojan horse mechanism for the spread of vesicular stomatitis virus in monocytes. *Virology* 147:231–236.
- Philler, M. A., et al. 2008. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* 46:515–521.
- Raschke, W. C., S. Batrla, P. Ralph, and I. Nakomiz. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15:261–267.
- Russell, D. G., and S. Gordon. 2009. Phagocyte-pathogen interaction: macrophages and the host response to infection, 1st ed. ASM Press, Washington, DC.
- Samaranayake, Y. H., and L. P. Samaranayake. 1994. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.* 41:295–310.
- Samaranayake, Y. H., P. C. Wu, L. P. Samaranayake, and P. L. Ho. 1998. The relative pathogenicity of *Candida krusei* and *C. albicans* in the rat oral mucosa. *J. Med. Microbiol.* 47:1047–1057.
- Samaranayake, Y. H., P. C. Wu, L. P. Samaranayake, M. So, and K. Y. Yuen. 1994. Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. *J. Med. Microbiol.* 41:250–258.
- Shao, X., et al. 2005. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *J. Immunol.* 175:3244–3251.
- Strasser, J. E., et al. 1999. Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* 162:6148–6154.
- Tucker, S. C., and A. Casadevall. 2002. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:3165–3170.
- Voeltz, K., D. A. Lammas, and R. C. May. 2009. Cytokine signalling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77:3450–3457.
- Zaragoza, O., M. Alvarez, A. Telzak, J. Rivera, and A. Casadevall. 2007. The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect. Immun.* 75:2729–2739.
- Zaragoza, O., et al. 2008. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell. Microbiol.* 10:2043–2057.
- Zaragoza, O., C. P. Taborda, and A. Casadevall. 2003. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur. J. Immunol.* 33:1957–1967.
- Zhao, X. R., and C. C. Villar. 2011. Trafficking of *Candida albicans* through oral epithelial endocytic compartments. *Med. Mycol.* 49:212–217.

Editor: G. S. Deepe, Jr.

Cryptococcus neoformans Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during Galleria mellonella Infection

Rodrigo García-Rodas¹, Arturo Casadevall², Juan Luis Rodríguez-Tudela¹, Manuel Cuenca-Estrella¹, Oscar Zaragoza^{1*}

¹ Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, ² Department of Microbiology and Immunology and Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, United States of America

Abstract

We have studied infection of *Cryptococcus neoformans* in the non-vertebrate host *Galleria mellonella* with particular interest in the morphological response of the yeast. Inoculation of *C. neoformans* in caterpillars induced a capsule-independent increase in haemocyte density 2 h after infection. *C. neoformans* manifested a significant increase in capsule size after inoculation into the caterpillar. The magnitude of capsule increase depended on the temperature, being more pronounced at 37°C than at 30°C, which correlated with an increased virulence of the fungus and reduced phagocytosis at 37°C. Capsule enlargement impaired phagocytosis by haemocytes. Incubation of the yeast in *G. mellonella* extracts also resulted in capsule enlargement, with the polar lipidic fraction having a prominent role in this effect. During infection, the capsule decreased in permeability. A low proportion of the cells (<5%) recovered from caterpillars measured more than 30 µm and were considered giant cells. Giant cells recovered from mice were able to kill the caterpillars in a manner similar to regular cells obtained from *in vivo* or grown *in vitro*, establishing their capacity to cause disease. Our results indicate that the morphological transitions exhibited by *C. neoformans* in mammals also occur in a non-vertebrate host system. The similarities in morphological transitions observed in different animal hosts and in their triggers are consistent with the hypothesis that the cell body and capsular responses represent an adaptation of environmental survival strategies to pathogenesis.

Citation: García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O (2011) *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. PLoS ONE 6(9): e24485. doi:10.1371/journal.pone.0024485

Editor: Robert A. Cramer, Montana State University, United States of America

Received: June 22, 2011; **Accepted:** August 11, 2011; **Published:** September 7, 2011

Copyright: © 2011 García-Rodas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: R.G.R. is supported by a FPI fellowship (reference BES-2009-015913), which funded her stay in Dr. Casadevall's laboratory during three months. A.C. was supported by NIH awards A1033774, HL059842, and A1033142. O.Z. is funded by grant SAF2008-03761 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: ozaragoza@icm3.csic.es

Introduction

The yeast *Cryptococcus neoformans* is the causative agent of cryptococcosis, a life-threatening fungal infection. *C. neoformans* infectious parities, probably consisting of spores [1,2], are believed to be acquired by inhalation. In immunocompetent hosts the infection is often asymptomatic while in patients with impaired immunity, and especially those with advanced HIV infection, there is often extrapulmonary dissemination leading to meningoencephalitis [3,4]. Although the incidence of HIV-associated cryptococcosis has declined in developed countries with the introduction of the highly active anti-retroviral therapy, its incidence in developing regions, such as sub-Saharan Africa remains very high, causing more than 650,000 deaths per year [5].

C. neoformans often causes chronic infection in both humans and animal hosts [3,6], but this stage of the infection is not well understood. There is indirect evidence that the inability of the host to clear the infection depends on the interaction with phagocytic cells and on the polysaccharide capsule surrounding the cryptococcal cells [7,8,9]. In this regard, capsular polysaccharides are potent immunomodulators that interfere with immune responses [10,11,12,13,14,15,16], and consequently the capsule is considered the major virulence factor [17]. However, when *C. neoformans* invades a host it also undergoes changes that contribute

to its persistence. These changes include capsule enlargement and the appearance of giant cells [18,19,20]. *C. neoformans* can infect a wide variety of hosts, such as the amoeba *Acanthamoeba castellanii*, the nematode *Caenorhabditis elegans*, the slime mold *Dictyostelium discoideum*, insects such as *Drosophila melanogaster* and the Lepidoptera *Galleria mellonella* [21,22,23,24,25,26]. Further extending its host range, *C. neoformans* has been shown to infect plants [27].

Some of the alternative models mentioned above are limited by the inability of the host system to survive at 37°C or the difficulty in administering exact fungal inoculum. These limitations do not apply to the *Galleria mellonella* model host. *C. neoformans* can proliferate in the *G. mellonella* haemocoel leading to the eventual death of the caterpillar [23]. Moreover, the *G. mellonella* model has been used to study host defense to fungal pathogens [28].

Although *C. neoformans* morphological changes have been described in yeast isolated from lungs of infected mice [18,29], their role during infection is not completely understood. The use of an alternative host, such as *G. mellonella*, provides a new system to investigate the importance of specific traits on virulence that has significant advantages over other hosts. We have investigated the interaction between *C. neoformans* and *G. mellonella* and report that cryptococcal infection in this host is also associated with significant morphological changes, such as capsule enlargement and the appearance of giant cells, which play an important role in evading

phagocytosis and infection development. Since these processes also occur in vertebrates, our observations indicate similar cellular responses by *C. neoformans* in very different types of hosts.

Results

Administration of *C. neoformans* produces a transient increase in haemocyte density

To characterize the interaction between *G. mellonella* and *C. neoformans*, we first reproduced the model infection and investigated aspects of the insect immune response during infection with this fungal pathogen. For this purpose, we inoculated larvae with different doses from H99 strain, and observed that the larvae died in a dose dependant manner (data not shown). *Galleria mellonella* induces innate responses, some of them based on the increase in the concentration of haemocytes in the haemolymph at different times [30,31]. Consequently, we enumerated the number of haemocytes present in the haemolymph at different times, and we observed that larvae injected with 10^4 *C. neoformans* cells showed a 7-fold increase in the number of haemocytes after 2 h of infection ($p < 0.05$). However, this response was not maintained during subsequent days (Figure 1A). Furthermore, we also tested a capsule-deficient strain of *C. neoformans* and its parental strain (*cap59* and B3501, respectively) and we did not observe any statistical differences in the haemocyte density of the larvae infected with these strains ($p = 0.5$) (Figure 1B) indicating that this response is capsule-independent. Heat-killed *C. neoformans* cells were also inoculated in larvae and no increase in haemocyte density was observed (result not shown).

C. neoformans morphogenesis during infection in *G. mellonella*

Since *C. neoformans* manifests morphological transitions during mammalian infection involving changes in the capsule and total size, we investigated whether similar changes occurred during *G. mellonella* infection. Hence, we measured the total cell diameter (capsule included), cell body size (delimited by the cell wall) and capsule diameter of yeast cells recovered from larvae incubated at 37°C at various times of infection. The size of cells grown in Sabouraud overnight used to infect the larvae was considered time zero for infection. *C. neoformans* cells manifested a significant increase in average cell size during infection in *G. mellonella* at all times tested (Figure 2). This increase was due to both an increase in the cell body size and in the size of the capsule when comparing to cells *in vitro* ($p < 0.05$, Figure 2).

Effect of capsule enlargement on phagocytosis

We then investigated if cryptococcal morphogenesis played a role in virulence in *G. mellonella*. Since initial infection of the larvae was associated with a strong recruitment of haemocytes in the haemolymph, we investigated the importance of capsule growth on haemocyte and phagocytosis. For this purpose, we induced capsule enlargement *in vitro* by incubating the cells in diluted Sabouraud liquid medium at neutral pH (see Material and Methods). When the larvae were infected with cells incubated in Sabouraud broth, we observed that approximately 20% of the haemocytes contained *C. neoformans* cells after 2 h of incubation (Figure 3A). In contrast, capsule enlargement completely inhibited phagocytosis (Figure 3A). However, when we compared the survival of the larvae infected with *C. neoformans* cells with either small or large capsules, we did not observe a difference in virulence (Figure 3B), indicating that initial phagocytosis did not predict the course of infection. To confirm that the capsule had an inhibitory role of phagocytosis by haemocytes, we infected larvae with encapsulated (H99 and B3501) and the *cap59* mutant (C536

strain). Phagocytosis percentage increased to around 30% when using the capsule-deficient strain (Figure 3C, $p < 0.05$). No differences in phagocytosis were observed when using encapsulated *C. neoformans* var. *grubii* H99 or *C. neoformans* var. *neoformans* B3501 cells (Figure 3C).

Temperature dependent morphogenesis of *C. neoformans* in *G. mellonella*

The virulence of *C. neoformans* in *G. mellonella* was reported to be decreased at 30°C compared to physiological mammalian temperature [23]. Consequently, we investigated whether this difference in virulence correlated with differences in morphogenesis. We first reproduced the temperature-dependent virulence phenotype, and as shown in Figure 4A, we confirmed that virulence of *C. neoformans* was enhanced at 37°C. We wanted to rule out that the enhanced virulence at 37°C was due to a better growth of the yeast at this temperature, so we performed growth curves at 30 and 37°C. We found that the growth rate was higher at 30°C than at 37°C (Figure 4B). In addition, we studied whether phagocytosis of *C. neoformans* was affected by the incubation temperature. To this end, we performed *in vitro* phagocytosis assays at both temperatures (Figure 4C). Two groups of larvae were inoculated with 10^6 cells of *C. neoformans* previously stained with Calcofluor White and incubated at both temperatures. After 2 h, haemolymph was obtained from 3 different larvae in every group to quantify phagocytosis. We observed that phagocytosis occurred more efficiently at 30°C than at 37°C ($p = 0.0011$). This data suggests that the immune system of the larvae is impaired at 37°C. However, and as shown in Figure 3, the initial phagocytosis does not correlate with the outcome of the infection, so we investigated the magnitude of morphological changes at 30 and 37°C. *C. neoformans* exhibited a significant increase in the size of both the cell body and the capsule during infection in *G. mellonella* at both temperatures (Figure 4D). However, this increase was statistically higher in cells from larvae at 37°C than from those kept at 30°C ($p < 0.05$) (Figure 4D).

Capsular rearrangements during infection in *G. mellonella*

We investigated if during *G. mellonella* infection, the capsule underwent changes not only in size, but also in structure. So we stained the capsule with mAb 18B7 conjugated to Alexa-488 and compared the immunofluorescence pattern of cells grown *in vitro* and cells recovered from caterpillars. In all cases, we found a clear annular binding pattern of the Ab to the yeast cells (Figure 5A). However, for cells recovered from *G. mellonella*, the mAb bound primarily to the outer regions of the capsule and there was little or no fluorescence signal from the regions close to the cell wall (Figure 5A), which suggested that infection in *G. mellonella* was associated with an increase in capsule density that reduced penetrability to the inner capsule. To confirm this idea, we investigated the penetration of 70 kDa fluorescent dextrans into the capsule. In cells grown *in vitro*, the dextran penetrated in the capsule to regions close to the cell wall, yielding a penetration to approximately 75% of the capsule diameter (Figure 5B, 5C). However, in cells isolated from *G. mellonella*, the dextran could not penetrate to the regions close to the cell wall (Figure 5B,C; penetration index around 45%), implying a reduction in permeability consistent with an increase in capsule density during infection in the insect.

Capsular enlargement *in vitro*

In addition to the *in vitro* experiments, we also performed *in vitro* experiments to study if *C. neoformans* induced capsule growth in the presence of specific caterpillar factors. In addition to a whole

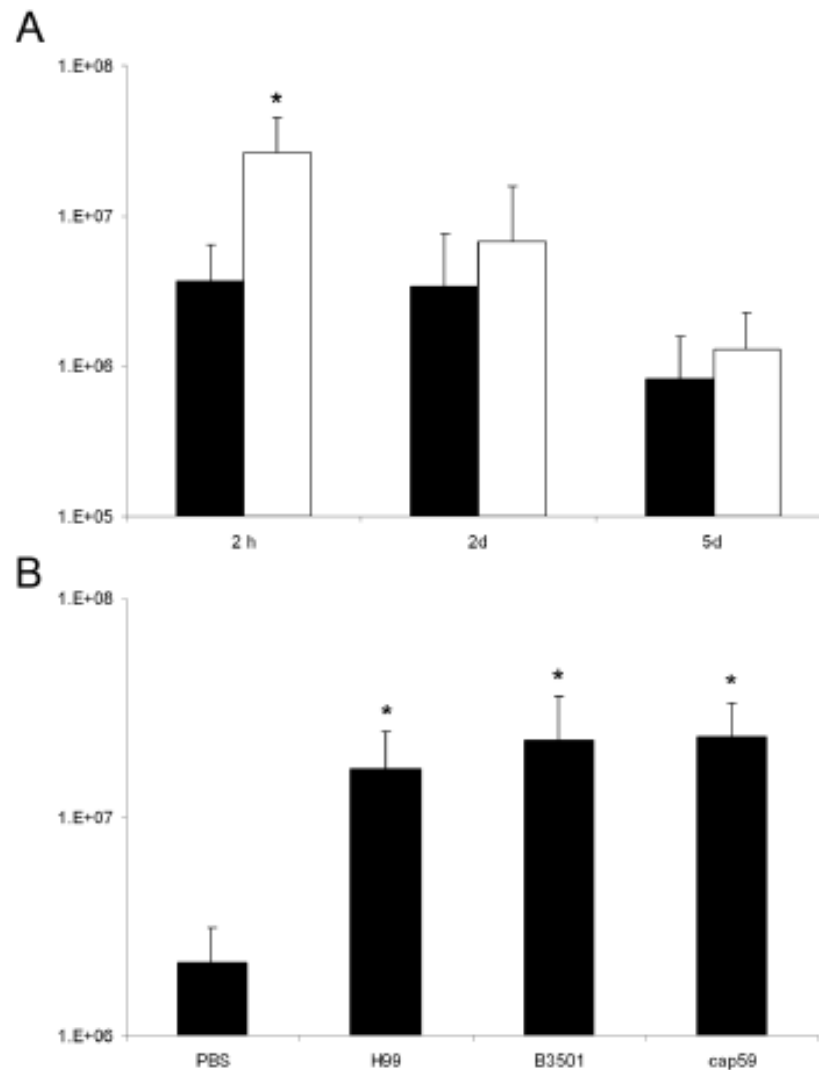


Figure 1. Haemocyte density in larvae after *C. neoformans* injection. A) Ten larvae were inoculated with 10^4 cells from H99 strain and haemocyte densities were assessed at different times (2 h, 2 d and 5 d). Black bars show haemocyte density of larvae injected with PBS and white bars of larvae injected with *C. neoformans*. B) Ten larvae per group were inoculated with 10^4 cells from H99, B3501 and the *cap59* mutant (C536) and haemocyte densities were assessed after 2 h after inoculation as described in Material and Methods. In both A and B, significant differences ($p < 0.05$) in haemocyte density relative to that in the PBS treated larvae are indicated with an asterisk. Experiments were repeated 3 times. doi:10.1371/journal.pone.0024485.g001

caterpillar extract, we also investigated a polar lipidic fraction, since similar fractions obtained from *Acanthamoeba castellanii* and murine macrophages can induce capsule growth [32]. Sabouraud liquid medium, PBS and 10% Sabouraud in 50 mM MOPS buffer pH 7.3 were also tested. We first analysed the growth of *C. neoformans* in each of the different fractions. Growth curves during the first 72 h revealed very similar *C. neoformans* growth in diluted Sabouraud medium (pH 7.3), complete *G. mellonella* extract and in the polar lipid rich fraction (Figure 6A). No growth was observed in PBS (Figure 6A). When we analyzed the size of the cells after 10 d, we observed that incubation of *C. neoformans* in complete *G. mellonella* extract and in the

polar lipid extract resulted in cell size enlargement, due to both cell body and capsule increase, compared to the same cells incubated in Sabouraud broth (Figure 6B) or in PBS in which cells showed a reduced size. In addition, the increase in capsule percentage obtained when *C. neoformans* was incubated in the polar fraction was similar to that observed in the capsule inducing medium (10% Sabouraud at neutral pH, see Figure 6B).

C. neoformans forms giant cells during infection

In addition to capsule enlargement, another significant morphological change associated with cryptococcal infection in

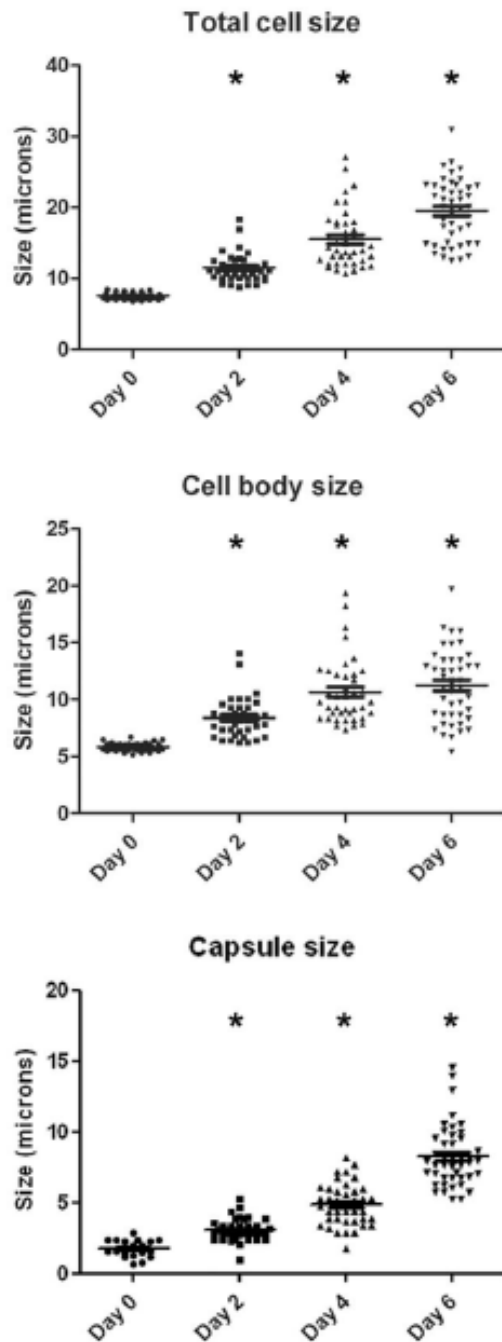


Figure 2. Morphogenesis of *C. neoformans* during infection in *G. mellonella*. Distribution of total cell size, cell body size and capsule diameter of *C. neoformans* cells grown in Sabouraud (T=0) and

recovered from *G. mellonella* caterpillars at different times after inoculation of 10^4 yeast cells. Total cell size was defined as the diameter of the complete cell including the capsule. The capsule diameter was calculated as the difference between the whole cell size and the cell body size. T-test and scatter plot graphs were obtained using Graph Pad Prism 5. The bar denotes the average of the distribution. Asterisks indicate $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0024485.g002

murine models is the appearance of giant cells (above 30 μm) [19,20]. In our *G. mellonella* model less than 5% of the cells recovered from day 6 infected larvae reached over 30 μm and thus could be considered giant cells (Figure 7A). However, cells with a diameter between 20–30 μm could be observed after 4 days in larvae infected with 10^4 yeast cells. This phenomenon was also observed in caterpillars infected with 10^2 and 10^3 inocula, but only after 6 days of infection (data not shown). We observed that giant cell formation involved a 75-fold increase in cellular volume relative to cells grown in Sabouraud liquid medium. The giant size of these cells was achieved not only by capsule enlargement, but also by an increase of the cell body size (Figure 7A).

Chitin-like structures in the capsule were reported by the specific binding of fluorescent wheat germ agglutinin, which binds to sialic acids and β -1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc) oligomers [33]. We used WGA to ascertain whether these structures were also present in giant cells recovered from *G. mellonella*. Cells grown *in vitro* bound WGA especially at the neck between the mother cell and the bud (Figure 7B). In cells recovered from caterpillars, these structures were particularly prominent (Figure 7B).

Giant cells virulence in *G. mellonella* model host

We used the *G. mellonella* model to investigate the virulence of giant cells formed in mice. For this purpose, we isolated giant cells from lungs of 3 week-infected mice. To separate giant from regular cells in the lung extract, we filtered the yeast suspension through 20 μm pore size filters, which have been shown to retain most of the giant cells [20]. As a control, we also used the cells that passed through the filter (of which the majority were of regular size) and cells grown in Sabouraud liquid medium overnight. We found that giant cells had the same virulence capacity as cells of regular size obtained from *in vitro* or *in vivo* (Figure 8A). To investigate whether the size of the giant cells was maintained during infection, fungal cells were recovered from larvae from every group at different times and their sizes measured. An increase in total cell size (capsule included) was found in cells recovered from larvae infected with cells grown *in vitro* and in those infected with *C. neoformans* with a cell size below 20 μm isolated from mouse lungs (Figure 8B). In contrast, in larvae infected with giant cells, the cells recovered after 2 d from the caterpillars had a decreased size, and giant cells were hardly found (Figure 8B). Nevertheless, after 5 d of infection cells isolated from larvae seemed to begin to increase their size again and they showed an average size of 26 μm (Figure 8B).

Discussion

Virulence of human pathogens has classically been studied in mammalian models, with mice being the most widely used species. In recent years there has been increasing interest in the use of other model hosts, given concerns about the expense and bioethical issues involved in vertebrate animal experimentation. However, the use of these alternative models must be validated before the results obtained can be extrapolated to more complex models, such as the mouse. In this sense, it is important to establish whether the interaction between non-vertebrate model hosts and

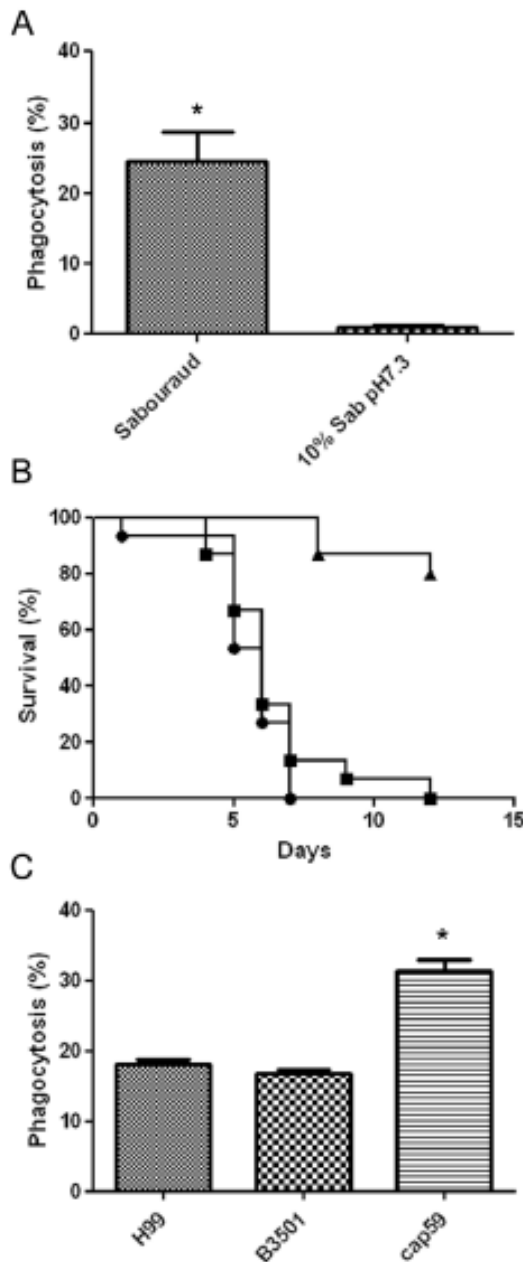


Figure 3. Role of the capsule on phagocytosis by haemocytes. A) Cells with small (grown in Sabouraud) and large capsule (incubated in 10% Sabouraud buffered with 50 mM MOPS pH 7.3) were stained with Calcofluor and used to infect caterpillars. Bars show the average phagocytosis at 2 h. $p < 0.05$ is indicated with an asterisk. The experiment was repeated twice in triplicates. B) Survival curves of *G. mellonella* infected with 10^4 cells of *C. neoformans* grown in Sabouraud broth and in 10% Sabouraud diluted in MOPS pH 7.3. C) *In vivo* phagocytosis using H99, B3501 and cap59 (C356) strains was performed as described in section A and quantified after 2 h of infection. Bars

show phagocytosis average after 2 h. P value below 0.05 is indicated with an asterisk.
doi:10.1371/journal.pone.0024485.g003

pathogens results in similar phenomena as observed with more conventional types of hosts. *Galleria mellonella* caterpillars have been used for the study of pathogenesis with such different pathogens as *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* [34,35,36,37,38]. Among human fungal pathogens, *Candida albicans* and some *Aspergillus* spp, such as *A. fumigatus* and *A. flavus*, also kill caterpillars [28,31,39,40]. The immune response elicited by *G. mellonella* during *C. neoformans* infection is very different from that elicited in mammalian cells. As invertebrates, insects lack adaptive immune responses and do not produce immunoglobulins. However, insects have powerful innate immune mechanisms that include the presence of haemocytes with phagocytic activity [41,42,43,44], which in some aspects resemble the activity of macrophages and neutrophils from the innate immune system of mammalian organisms. In addition, another part of the innate immune response in insects depends on the role of reactions catalyzed by a phenoloxidase that enable to encase pathogens in melanin [45]. *C. neoformans* induced a 7-fold increase in haemocyte density in caterpillars during the first 2 h of infection. This acute response was capsule and strain independent and not maintained in time, but required living cells. Hence, *C. neoformans* in mammals and insects is likely to encounter different challenges for survival. Consequently, the question of how *C. neoformans* responds in the setting of mammalian and insect infection is relevant for our understanding of pathogenesis and the origin of virulence of this fungus.

Morphological changes have been described in mouse models during the infection in the lungs. These morphological changes include capsule enlargement and the formation of giant cells, which could be important for the persistence of the yeasts in the host. We have confirmed that similar changes occur during infection in *G. mellonella*, which supports the idea that this model can be used to study morphological aspects of *C. neoformans* infection, which might be then extrapolated to mouse models. In addition, *G. mellonella* offered a simple model to study the importance of morphogenesis in virulence. In this sense, we found that capsule enlargement inhibited phagocytosis. The mechanism by which capsule growth impairs phagocytosis by haemocytes is unknown, but a similar situation is observed with complement-mediated phagocytosis of *C. neoformans* by murine macrophages [46]. But it cannot be discarded that capsule growth inhibits phagocytosis by producing cells of larger size which cannot be ingested by haemocytes. However, the initial size of the capsule did not influence virulence of the strain, most probably due to the fact that during infection, cells with small capsule manifest capsular enlargement, and consequently, become similar to those incubated in capsule inducing medium. Moreover, our findings suggest that the initial phagocytosis does not correlate with the subsequent development of the disease, so the consequences of the increase in haemocyte density and the exact role of phagocytosis in protection against cryptococcal infections deserve future study. In agreement with the antiphagocytic role of the capsule, we observed that phagocytosis was increased when we used a capsule-deficient strain, a situation with strong resemblance to the observation that acapsular strains are readily ingested by mammalian macrophages [47,48]. The capsule completely inhibits phagocytosis, and in the case of mammalian macrophages, phagocytosis of regular encapsulated *C. neoformans* strains completely depends on the presence of opsonins, such as complement or antibodies (see review in [9]), and for this reason, few hours

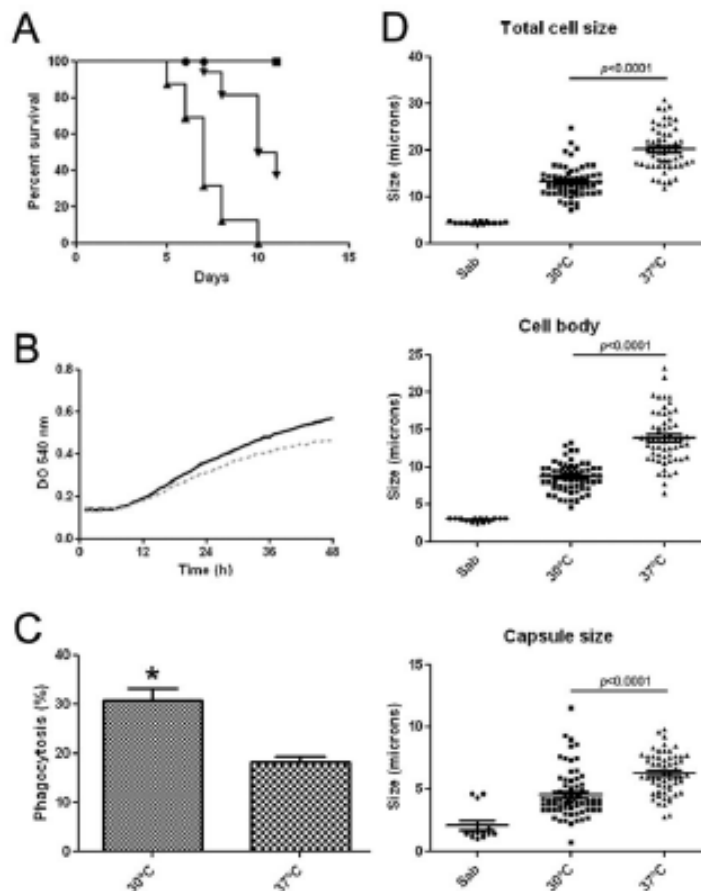


Figure 4. Temperature dependent virulence and morphogenesis of *C. neoformans* in *G. mellonella*. A) Survival curves of *G. mellonella* infected with 10^4 H99 cells. Sixteen larvae per group were incubated at 30°C (▼) and 37°C (▲). A group of larvae were injected with PBS and kept at 30°C (●) and at 37°C (■) to control the trauma of the injection. B) Growth curves of H99 strain at 30°C (Black line) and at 37°C (grey dotted line) during 48 h. C) In vivo phagocytosis was performed as described in Material and Methods and quantified after 2 h of incubation of the larvae at 30°C and 37°C. $P < 0.05$ is indicated with an asterisk. D) Distribution of total cell size, cell body size and capsule diameter of *C. neoformans* cells grown in Sabouraud (Sab) and recovered from *G. mellonella* caterpillars at different temperatures after 6 d of infection. T-test and scatter plot graphs were performed using Graph Pad Prism 5. The line in each sample denotes the average of the distribution. doi:10.1371/journal.pone.0024485.g004

after intratracheal infection, most of the fungal burden is found inside phagocytic cells [49]. In *G. mellonella*, we found that around 20% of haemocytes contained *C. neoformans* cells after 2 h of infection, and we believe that this phagocytosis is also produced by insect opsonins.

We noted another instance where capsule and cell enlargement correlated with virulence, which is the different virulence shown by *C. neoformans* at different temperatures [23]. This difference was not explained by a better growth of the yeast at high temperature, but correlated with decreased phagocytosis and a larger capsule, which we believe translates into phagocytic avoidance. This data is also in agreement with previous findings that demonstrated that capsule enlargement *in vitro* was enhanced at physiological temperature [50]. In addition to this enhanced fungal response, the immunity of the larvae seems to be diminished at 37°C, as shown by the reduced phagocytosis measured at this temperature.

Capsular enlargement in *G. mellonella* was associated with a decrease in the permeability of the capsule, a phenomenon that might have also important consequences for the recognition of the pathogen by the host. Increases in capsule density can affect penetration of antifungal molecules and the binding of opsonins on the capsule. Capsular rearrangement in the *C. neoformans* capsule was described both during infection [51,52] and *in vitro* [50,53,54], and this phenomenon has been associated with cellular aging [53]. Our findings highlight that this particular ability of *C. neoformans* to modulate capsular structural features might have important consequences for multiple types of interactions, with both the environment and the host.

The molecular mechanisms that allow capsule enlargement are unknown. A common feature of capsule growth is that it occurs in poor nutritional conditions, where normally the growth rate of the yeast is impaired, so it is possible that one parameter that

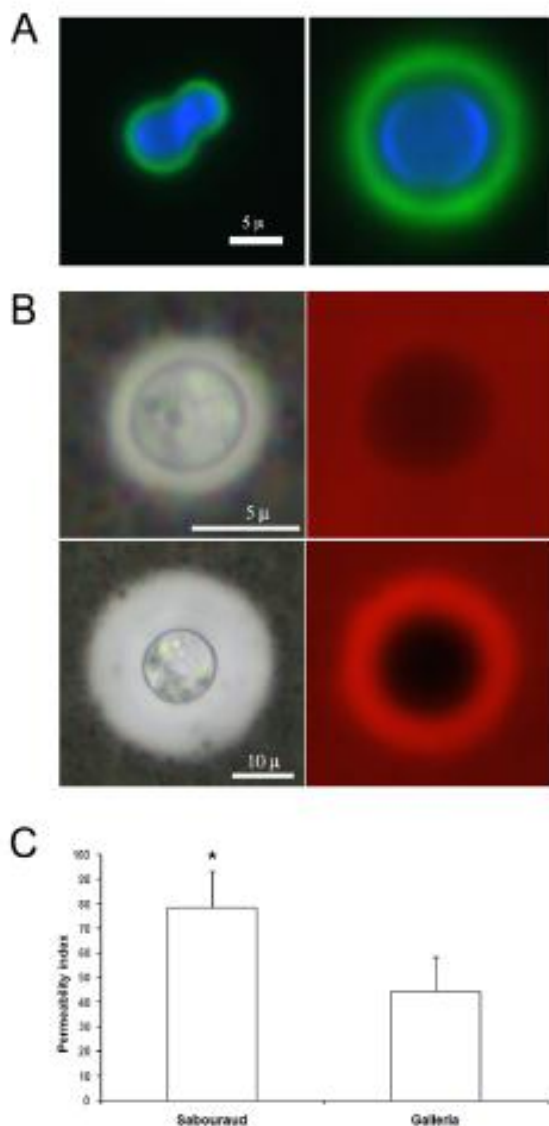


Figure 5. Capsular permeability of *C. neoformans* cells isolated from *G. mellonella*. A) Immunofluorescence staining of the capsule with mAb18B7-Alexa 488 (green fluorescence) and of the cell body (blue fluorescence) of cryptococcal cells grown in Sabouraud broth and recovered from caterpillars infected with 10^4 cells per larva after 6 d. Scale bar in left panel applies to both. B) Penetration of 70 kDa dextran Rhodamine labeled into the capsule and estimation of total capsule size by India ink staining. Upper panel shows cells grown in Sabouraud broth and lower panel cryptococcal cells recovered after 6 d from caterpillars infected with 10^4 cells per larva. Scale bar in left panel applies to both. C) Distribution of permeability index calculated for cells grown in Sabouraud liquid medium (Sabouraud) and for cells recovered from infected larvae (Galleria). T-test p value = 0.0006. doi:10.1371/journal.pone.0024485.g005

contributes to capsule growth is a decrease in cell division rate. Although this concept might be true, we believe that capsule enlargement is also induced by host specific factors. We were able to induce capsule enlargement by incubating cryptococcal cells

with caterpillar extracts, and in particular, with the polar lipidic fraction, which is in agreement with recent findings of *C. neoformans* using extracts from *Acanthamoeba castellanii* and macrophages [32]. In these conditions, growth rate was compromised, so we argue that decreased growth is required to induce capsule enlargement in the presence of specific inducers, such as host lipids. Conservation of this effect in insects supports the view that phospholipid sensing might be a general response that is stimulated by common elements present in different hosts.

The formation of *C. neoformans* giant cells could pose a major problem to the immune system simply by virtue of their size [19,20]. In this work, we isolated giant cells from caterpillars after 6 d of infection at 37°C. Furthermore, in the *G. mellonella* model, cells of 20–30 μ m could be observed by 4 d post-infection in larvae infected with 10^4 inoculum, and at day 6 in larvae infected with 10^2 and 10^3 cells. Consequently, we surmise that infection with 10^2 or 10^3 was better controlled by caterpillar haemocytes. Giant cells isolated from *G. mellonella* manifested several similarities with the giant cells isolated from mice, such as the presence of chitin-like structures which might be involved in the movement of the bud through the capsule of the mother cell [33]. However, we also noticed structural differences between giant cells obtained from *G. mellonella* and mice. Giant cells from mice were consistently larger than those obtained from the insect, and had prominently enlarged cell walls [20]. Although it is possible that giant cells formed in insects and in mammals are different, we believe that the most likely explanation for the differences observed is the time of infection. In mice, we routinely recover the giant cells after 3 weeks of infection, so the yeasts have more time to become larger and develop specific structural features than in the insect model, since they are obtained only after 6 d of infection due to short lifespan of infected caterpillars. This makes very difficult to obtain giant cells from infected insects for a longer time. In addition, giant cells from mice were polyploid [19,20], which suggests a mechanism of giant cell formation by endoreduplication. In the case of giant cells obtained from *G. mellonella*, this aspect could not be studied due to the relatively scarce number of giant cells recovered from the larvae, which precluded the use of specific techniques, such as DNA staining and analysis by flow cytometry, to measure the DNA content. Despite these differences, our results indicate that *G. mellonella* offers a simple system to study the early stages of giant cell formation and could be used as a rapid and inexpensive model to screen for mutants affected in this process.

In addition, *G. mellonella* can be used to study specific aspects of cryptococcal virulence. For example, we observed that giant cells isolated from mice can kill the caterpillars in a very similar way to cells of regular size, obtained from both *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, 2 d after infection with giant cells, most of the cells recovered from larvae were not giants, indicating that giant cells *in vivo* produced smaller cells, as we observed *in vitro* [20]. Since giant cells have been shown to be more resistant to some stress factors [20], the observation that giant cells can produce infection provides support for the notion that such cells could contribute to latency and reactivation by virtue of their relatively invulnerability to host defense mechanisms, since they are too large to be ingested [19,20]. In this regard, we hypothesize that giant cells could linger in the lung and provide a source of infection with the daughter cells being capable of extrapulmonary dissemination, when hosts become immunosuppressed.

C. neoformans factors involved in mammalian pathogenesis are also involved in the survival of *C. neoformans* within non mammalian hosts [23,55,56]. In this work, we have shown that *G. mellonella* provides a useful model to study morphological cellular and capsular changes previously detected in mammal host. Moreover, the ability to recover giant cells from caterpillars could

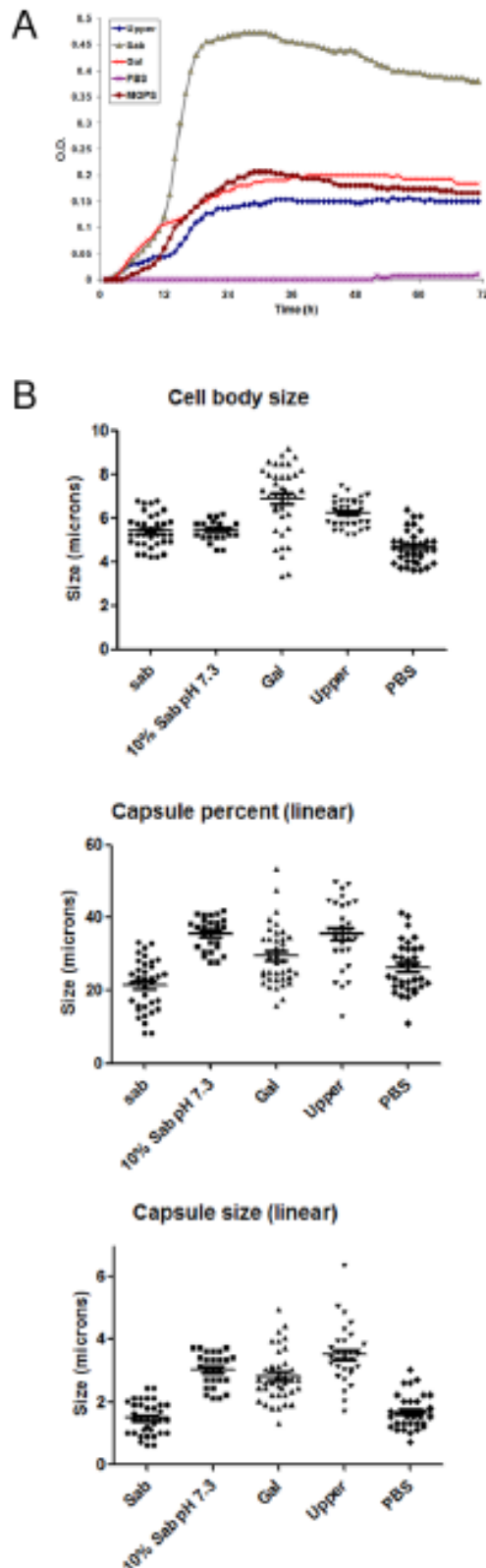


Figure 6. In vitro capsule and cellular enlargement of *C. neoformans* in *G. mellonella* extracts. Larvae were homogenized and different extracts were prepared as described in Material and Methods. **A**) Growth curves in Sabouraud (▲), 10% Sabouraud diluted in 50 mM MOPS pH 7.3 (●), total *G. mellonella* extract (x), Upper phase of *G. mellonella* extract, containing polar lipids (•) and PBS (○) at 37°C during 3 d. **B**) Distribution of total cell size, cell body size and capsular diameter of *C. neoformans* cells in Sabouraud (Sab), Sabouraud buffered with MOPS (10%Sab pH 7.3), *G. mellonella* extract (Gal), upper phase of *G. mellonella* lipid extraction (Upper phase) and PBS at 37°C for 10 d. T-test comparing cells in different media to cells grown in Sabouraud broth and scatter plot graphs were done using Graph Pad Prism 5. The line in each sample denotes the average of the distribution. $P < 0.05$ is indicated with an asterisk.

doi:10.1371/journal.pone.0024485.g006

significantly enhance our ability to study this enigmatic cell type using *G. mellonella* as it constitutes an inexpensive non-vertebrate animal host. Our results also contribute to the understanding of the origin of cryptococcal virulence since they imply the existence of similar survival strategies in mammalian and insect hosts despite major differences in the immune response of these animals. Consequently, these observations support the notion that the pathogenic potential of *C. neoformans* for animal hosts is a consequence of selection pressures in the environment that resulted in attributes also suitable for animal virulence [26,57].

Materials and Methods

Strains and media

The *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99 strain, also known as ATCC 20882 [58,59], was used throughout the study. *C. neoformans* var. *neoformans* B5301 strain [60] and the capsule-deficient strain C536 (which has a deletion in the *CAP59* gene, [61]) were also used in some experiments. *C. neoformans* cultures were grown in liquid Sabouraud medium at 30°C with moderate shaking (150 r.p.m.). To induce capsule enlargement, the cells were incubated in 10% Sabouraud buffered at pH 7.3 with 50 mM MOPS [62].

Galleria mellonella survival experiments

The *Galleria mellonella* larvae (Vanderhorst Wholesale, Inc, St Marys, OH and Mous Livehait R.J., The Netherlands) used for experiments were selected to be similar in size and absent of any grey markings for reproducible results.

The selected larvae were inoculated with 10 μ L of a yeast suspension prepared at different cell densities by an injection in the last left pro-leg using a 26 gauge needle with Hamilton syringes. The syringes were prepared prior to the experiment by cleaning them with bleach and ethanol. Before injection, the pro-leg area was cleaned with 70% ethanol using a swab. After injection, caterpillars were incubated in 90 mm plastic Petri dishes (Soria genlab, S.A., Madrid, Spain) at 37°C or at 30°C, and the number of dead caterpillars was scored daily. A group of caterpillars was inoculated with PBS in each experiment to monitor killing due to physical injury and another group of caterpillars without any manipulation was carried out in parallel as an untreated control. Killing curves were plotted and estimation of differences in survival was analyzed by the Kaplan-Meier method using Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Every experiment was repeated at least twice, obtaining always similar results. Data presented here are from a representative experiment.

Isolation of *C. neoformans* cells from *G. mellonella*

To isolate the yeasts from *G. mellonella*, larvae were smashed using cell strainers of 100 μ m pore size (BD Falcon, Erembo-

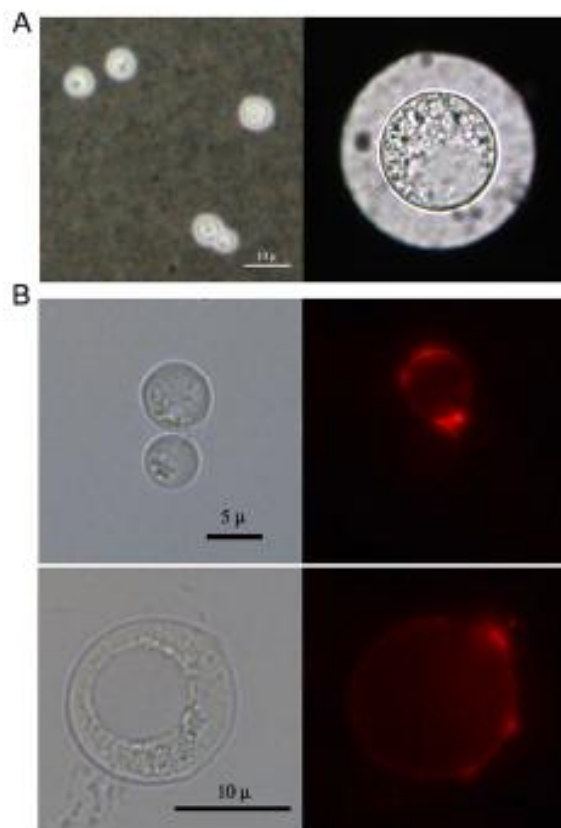


Figure 7. *Cryptococcus neoformans* forms giant cells in *Galleria mellonella*. A) Figure shows photographs of *C. neoformans* cells suspended in India ink after overnight growth in Sabouraud broth and giant cells recovered from *G. mellonella* after 6 d of infection. Scale bar applies to both panels. B) Binding of wheat germ agglutinin to *C. neoformans* as described in Material and Methods. Upper panels show cells grown in Sabouraud broth and lower panels show a representative cell recovered from caterpillars after 6 d of infection. doi:10.1371/journal.pone.0024485.g007

degren, Belgium) and 10 mL syringe plungers (BD Plastipak, Madrid, Spain). Homogenates were collected in 1 mL of PBS and samples were washed twice and suspended in 150 μL of PBS.

Fungal cells were suspended in India ink (Remel Bactidrop, Lenexa, KS, USA), observed by microscopy and photographed. Photographs were taken using a Leica DMI 3000B microscope in all experimental work. In parallel, cryptococcal cells grown overnight in Sabouraud broth were observed by microscopy, photographed and used to infect the larvae.

Cell and capsule sizes were measured using Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA). Total cell size was defined as the diameter of the complete cell including the capsule. Capsule size was calculated as the difference between the diameter of the total cell and the cell body diameter, defined by the cell wall. T-test and scatter plot graphs were done using Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). A *P* value < 0.05 was considered significant.

G. mellonella extract preparation and lipid extraction

Twenty to thirty larvae were smashed in PBS and the homogenate was collected and centrifuged at 3000 r.p.m. for

5 min. Total extracts were obtained after filtering the supernatant through 0.22 μm pore size filters (Millex, Co. Cork, Ireland). To obtain polar lipidic fractions, we followed the protocol described in [32]. Briefly, the total extract was incubated with a mixture of chloroform and methanol (2:1, v/v) for 3 h on a benchtop rocker at room temperature. The samples were then centrifuged for 10 min at 2500 r.p.m. for phase partitioning. The upper phase was collected and dried overnight in a vacuum centrifuge. The pellet was finally suspended in PBS.

Capsular enlargement assay upon fractionation

Total *G. mellonella* extract and the lipidic fraction were tested for capsule enlargement with *C. neoformans* strain H99. Sabouraud liquid medium, diluted Sabouraud (10%) in 50 mM MOPS pH 7.3, and PBS were also tested in parallel. A ninety six-well plate was used to incubate 10^4 cells per well in triplicates with the different media at 37°C with shaking for 10 d. Capsular size was measured as described above.

Immunofluorescent staining of the capsule

Suspensions of *C. neoformans* recovered from caterpillars after 6 d of infection and *C. neoformans* grown in Sabouraud broth overnight at 30°C were stained with mAb18B7 [63] conjugated to Alexa 488 at a final concentration of 10 μg/mL for 30 min at 37°C in the dark. Samples were washed 3 times with PBS and incubated with 0.1% Uvitex for 15 min at room temperature in dark. Samples were then washed 4 times and the pellets were suspended in 0.1 M n-propyl-gallate (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS. Photographs were taken using an Olympus IX70 microscope (Olympus America, Melville, NY).

Wheat germ agglutinin staining

To evaluate the presence of chitin-like structures, fungal cells grown in Sabouraud liquid medium at 30°C overnight and cells recovered from *G. mellonella* larvae 6 d post-infection were stained with wheat germ agglutinin (WGA) as reported previously [33]. Briefly, the cells were washed with PBS, suspended in 4% p-formaldehyde cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) and incubated for 30 min at room temperature. The fixed cells were then washed with PBS and suspended in 100 μL of 5 μg/mL WGA conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes, Invitrogen) for 1 h at 37°C. Cell suspensions were mounted on glass slides and photographed with a Leica DMI 3000B fluorescence microscope.

Capsule penetrability assay

Capsule penetrability assays were performed as described in [52] to define the porosity of the capsule to macromolecules. Briefly, suspensions of *C. neoformans* recovered from caterpillars 6 d after infection and *C. neoformans* grown in Sabouraud broth overnight at 30°C were suspended in a mixture of India ink and 3.6 μg/mL of 70 KDa Rhodamine fluorescent dextran (Sigma). Samples were taken from those suspensions and photographed were taken in bright field and in Rhodamine filter. Total cell size and cell body size were measured in India ink suspensions as described above. The area of the capsule where the dextran did not penetrate was also measured by Rhodamine. The penetrability index was calculated as follows: Total capsule size was estimated after suspension in India ink, and the penetration of Rhodamine labeled dextran was measured in parallel by subtracting the diameter not penetrated by the fluorescent dextran from the total cell body. The permeability index was defined with these two values as the percentage of the capsule that was penetrated by the fluorescent dextran referred to the total size of the capsule. Cells

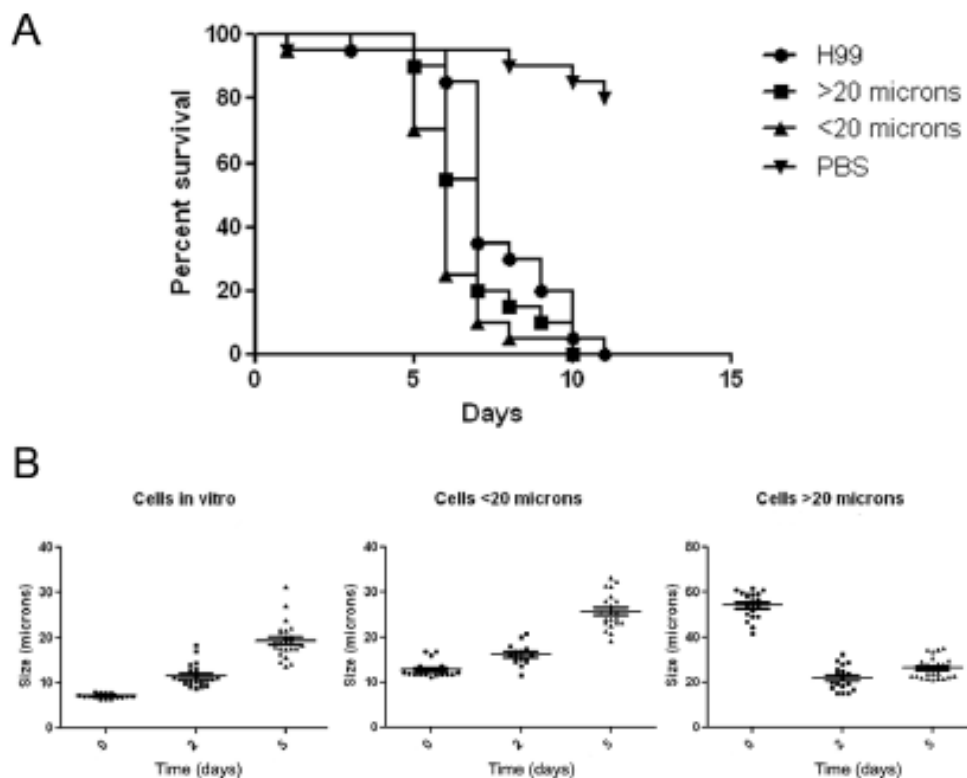


Figure 8. Survival of *G. mellonella* infected with giant cells isolated from mice. A) Balb/c mice were infected with H99 strain, and after 17 d, yeast cells recovered from the lungs were separated according to their size. Two different samples were obtained: cells smaller than 20 μm or cells larger than this size. Yeast cells incubated overnight in Sabouraud were carried out in parallel. Twenty larvae per group were inoculated with 10 μL of $3 \times 10^5/\text{mL}$ suspension of the 3 different *C. neoformans* preparation: Sabouraud (indicated in the figure as H99), cells from mice of regular size (<20 μm) and giant cells (>20 μm). Since yeast cells from mice were treated with Streptomycin to reduce bacterial contamination (see Material and Methods), a group of larvae was inoculated with 1% Streptomycin in PBS as a control. B) Distribution of cells recovered from caterpillars from the different groups at different times of infection (days 0, 2 and 5). doi:10.1371/journal.pone.0024485.g008

were measured using Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA) and statistics and graphs were obtained using Graph Pad Prism 5 as explained previously.

C. neoformans growing curves in Sabouraud liquid medium at 30°C and 37°C

C. neoformans strain H99 was grown overnight at 37°C with moderate shaking. Suspensions of *C. neoformans* at $10^5/\text{mL}$ and $10^3/\text{mL}$ were prepared in Sabouraud and 200 μL were inoculated in a 96-well plate (Costar, NY, USA) and incubated for 48 h with moderate shaking every 30 min in an iEMS Spectrophotometer (ThermoFisher). Optical density at 540 nm was measured every hour and graphs were plotted using Graph Pad Prism 5. The growth curves were performed at both 30°C and at 37°C in different days in triplicates.

In vivo phagocytosis assays

C. neoformans was grown in liquid Sabouraud medium as described above and stained with Calcofluor White (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA) at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min at 37°C. In some experiments, yeast cells with enlarged capsules induced by an overnight incubation in 10% Sabouraud buffered at pH 7.3 with 50 mM MOPS were used. After incubation, cells were

washed twice with PBS and suspended at 10^8 cells/mL. Larvae were infected with 10 μL of the inoculum (10^6 cells) and incubated at 37°C. In some experiments, a group of infected larvae was incubated also at 30°C. After 2 h, haemolymph was obtained from the caterpillars by insertion of a lancet into the haemocoel. Haemolymph was collected in eppendorf tubes containing an equal amount of an anticoagulant and antimelanization buffer IPS (Insect Physiological Saline: 150 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride, 10 mM Tris-HCl pH 6.9, 10 mM EDTA and 30 mM sodium citrate) and were centrifuged at 1500 r.p.m for 5 min to separate the haemocytes from the humoral fraction. Pelleted haemocytes were washed twice with the same buffer and the haemocytes were placed on coverslips and allowed to adhere for 40 min. Coverslips were placed on the slides with Fluoromount G and pictures were taken to quantify the phagocytosis with a Leica DMI 3000B fluorescent microscope. Experiments were performed in different days in triplicates. T-test (Microsoft Excel) was used to analyze the data and a p value < 0.05 was considered significant.

Determination of haemocyte density

Larvae were inoculated with 10 μL of a $10^6/\text{mL}$ suspension of either H99, B3501, C536 strains. In some experiments, *C.*

neofowans cells killed by incubation at 60°C for 45 min were also inoculated as control. Haemocyte density was assessed by obtaining the haemolymph from 10 larvae after different times (2 h, 2 d, 5 d) after the administration of the inoculum as described above. Haemolymph was immediately diluted 1:1 in IPS buffer to prevent melanization. Density was assessed by counting the haemocytes using a haemocytometer. All determinations were performed on 4 independent experiments.

Galleria mellonella survival experiment with cells recovered from infected mice

BALB/c mice were infected intratracheally with 50 µL of a 2×10^6 /mL suspension in PBS of H99 cells grown overnight at 30°C in Sabouraud liquid medium as described in [64]. Autoclaved food, bedding and bottles were used to maintain the animals. To minimize bacterial contamination, 1 g/L tetracycline hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the sterile drinking water. After 17 d, mice were euthanized using CO₂ and lungs were isolated. All the animal procedures used in this study were approved by the Bioethical Committee for Animal Welfare for the Instituto de Salud Carlos III (approved protocol PA-39). Lung tissue was then homogenized in 10 mL of PBS containing 1% Streptomycin and 1 mg/mL collagenase (Roche, Mannheim, Germany). The use of Streptomycin avoided bacterial contamination through the purification procedure, and for that reason, was included in all the buffers and solutions used. The cell suspension was incubated for 90 min at 37°C with occasional vortex agitation, and washed several times with sterile distilled water. Cell suspension was filtered through a 20 µm filter (Millipore, Ireland) to separate cells with a cell body diameter larger than 20 µm from smaller cells. In parallel, cells from H99 strain incubated in Sabouraud broth overnight at 30°C were also examined as control. After determining the cell density of the different cell fractions recovered from the mice, suspensions of 3×10^5 cells/mL in PBS containing 1% Streptomycin were

prepared. An aliquot of these samples was plated on Sabouraud agar plates to confirm the number the CFUs and the absence of bacterial contamination of the samples.

Twenty larvae per group were injected as described previously. A group of larvae was injected with PBS containing 1% Streptomycin. Larvae were incubated at 37°C and the number of dead caterpillars was scored daily. Differences in the survival of the various groups were analyzed by the Kaplan-Meier method using Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

At selected time intervals after inoculation larvae were homogenized and cryptococcal cells were recovered from every group. Cells were suspended in India ink and several pictures were taken. Total cell size, was measured using Adobe Photoshop and graphs and statistic analysis were performed using Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

Statistical analysis

Graphs and statistical comparisons (Student's *t*-test) were performed using Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) and Microsoft Excel.

Acknowledgments

We thank Dr. Mylonakis (Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts) for his training on the use of *G. mellonella* as model host at the Molecular Mycology Advanced Course (Woods Hole, 2010), which was key for the development of this work. We also thank Dr. Kwon-Chung (NIAID/NIH, Bethesda, Maryland), for the kind gift of the C336 strain, and Dr. Brevio (University of Insubria, Varese, Italy) for technical hints.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OZ RGR AC MCE JLR. Performed the experiments: RGR OZ. Analyzed the data: RGR OZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: OZ AC MCE. Wrote the paper: RGR AC JLR MCE OZ.

References

1. Bots MR, Hall CM (2010) Daring in the lung: how *Cryptococcus neoformans* spore the host for survival. *Curr Opin Microbiol* 13: 437–442.
2. Velgacudi R, Hauch VP, Geuntes-Boyer S, Wright JR, Heitman J (2009) Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77: 4345–4355.
3. Casadevall A, Perfect JR (1998) *Cryptococcus neoformans*. *Proc A*, ed. Washington DC: ASM Press, 541 p.
4. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (2011) *Cryptococcus*. From human pathogen to model yeast; *Proc A*, ed. Washington DC: ASM Press, 620 p.
5. Pack BI, Wasmuth KA, Marton BJ, Govender N, Pappas PG, et al. (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525–530.
6. Goldman DL, Lee SC, Mednick AJ, Montella L, Casadevall A (2000) Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular persistence, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* 68: 832–838.
7. Grijpstra J, Tefen B, van Die I, de Cock H (2009) The *Cryptococcus neoformans* *gpi10* and *gpi19* mutant strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57: 142–150.
8. Fonseca FL, Nohara LI, Cordero RJ, Fries S, Casadevall A, et al. (2009) Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infect Immun* 78: 3861–3870.
9. Zaragoza O, Rodriguez ML, De Jesus M, Frares S, Darachova E, et al. (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133–216.
10. Monari C, Bistoni F, Vecchiarelli A (2006) Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res* 6: 537–542.
11. Monari C, Percolini F, Bistoni G, Casadevall A, Kozel TR, et al. (2005) *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of *fas* ligand in macrophages. *J Immunol* 174: 3461–3468.
12. Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Tascini C, Bistoni F, et al. (1996) Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. *Infect Immun* 64: 2897–2903.
13. Vecchiarelli A (2005) The cellular responses induced by the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* differ depending on the presence or absence of specific protective antibodies. *Curr Mol Med* 5: 413–420.
14. Vecchiarelli A, Betella D, Lupo P, Bistoni F, McFadden DC, et al. (2003) The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol* 74: 370–378.
15. Chiu W, Verheul AF, Vainshuv VV, Chemiak R, Schramm J, et al. (1997) *Cryptococcus neoformans* and cryptococcal glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein induce different levels of tumor necrosis factor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 65: 272–278.
16. Dong ZM, Murphy JW (1997) Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. *Infect Immun* 65: 557–563.
17. McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A (2006) Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun* 74: 1500–1504.
18. Feldmesser M, Kren V, Casadevall A (2001) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Micromorphology* 147: 2355–2365.
19. Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Chastier C, Baltes NJ, et al. (2010) Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* 6: e1000953.
20. Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nounchuk JD, Cuervo-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, et al. (2010) Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog* 6: e1000945.
21. Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, et al. (2004) Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell* 3: 413–419.
22. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB (2002) Killing of *Candida albicans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15675–15680.

23. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Ichum A, Heitman J, et al. (2003) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 71: 3842–3850.
24. Steenbergen JN, Nounchuk JD, Mallikar SD, Casadevall A (2003) *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Drosophila discolor*. *Infect Immun* 71: 4862–4872.
25. Steenbergen JN, Nounchuk JD, Mallikar SD, Casadevall A (2004) Interaction of *Blasotrypa dematioides*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 72: 3478–3488.
26. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15245–15250.
27. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J (2007) The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* 1: 263–273.
28. Fuchs BR, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1: 475–482.
29. Goldman DL, Fries BC, Franquet SP, Montella L, Casadevall A (1998) Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14967–14972.
30. Benin D, Brennan M, Kavanagh K (2003) Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 5: 1389–1395.
31. Brennan M, Thomas DV, Whiteway M, Kavanagh K (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34: 153–157.
32. Chisman CJ, Albuquerque P, Guzman AJ, Nieves E, Casadevall A (2011) Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. *PLoS Pathog* 7: e1002047.
33. Rodriguez MI, Alvarez M, Fonseca FL, Casadevall A (2008) Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitin-like structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* 7: 600–609.
34. Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Denkard E (2003) Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 71: 2404–2413.
35. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 182: 3843–3845.
36. Morton DB, Burnett RJ, Chadwick JS (1984) Structural alterations in *Pistia nubilus* as a result of exposure to haemolymph from the larvae of *Galleria mellonella*. *Microbios* 39: 177–185.
37. Cyrensis M, Zdybicka-Boras A, Jakubowicz T (2007) The involvement of protein kinase A in the immune response of *Galleria mellonella* larvae to bacteria. *Acta Biochim Pol* 54: 167–174.
38. Hu K, Li J, Li B, Webster JM, Chen G (2006) A novel antimicrobial peptide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Rhizoglyphus laminarum* (Entomobacteriaceae). *Bioorg Med Chem* 14: 4677–4681.
39. Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K (2004) Correlation between glutathione production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158: 73–79.
40. St Leger RJ, Soren SE, Shams-Pirizadeh B (2000) Lack of host specialization in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 320–324.
41. Tojo S, Nagamura F, Ando K, Yokoi S (2000) Involvement of both granular cells and plasma cells in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 46: 1129–1135.
42. Rivio MF, Mouton M, Nappi AJ (2010) A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Dev Comp Immunol* 34: 991–998.
43. Dubovskiy IM, Krikova NA, Glupov VV (2008) Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 98: 360–362.
44. Benin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K (2005) Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun* 73: 4161–4170.
45. Connors L, Lee BL, Soderhall K (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 29: 263–271.
46. Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A (2003) The efficiency of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Euro J Immunol* 33: 1957–1967.
47. Kozel TR, Gotschlich EC (1982) The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol* 129: 1675–1680.
48. Kozel TR, Pinner GS, Goerlin AS, Highison RA, Highison GJ (1988) Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2: S436–S439.
49. Feldmesser M, Kras V, Novikoff P, Casadevall A (2000) *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68: 4225–4237.
50. Zaragoza O, Tebak A, Bryan RA, Dadachova F, Casadevall A (2006) The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* 59: 67–83.
51. Chaker C, Chantier F, Baudrimont M, Morelet F, Lortholary O, et al. (2005) Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 166: 421–432.
52. Gates MA, Thekildon P, Kozel TR (2004) Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* 52: 13–24.
53. Mazon ME, Dadachova F, Casadevall A, Zaragoza O (2007) Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot Cell* 6: 95–109.
54. Herin LM, Doering TL (2001) Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 41: 105–115.
55. Fuchs BR, Mylonakis E (2006) Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol* 9: 346–351.
56. London R, Omazo BS, Mylonakis E (2006) The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res* 6: 567–573.
57. Steenbergen JN, Casadevall A (2003) The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 5: 667–675.
58. Perfect JR, Lang SDR, Durack DT (1980) Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol* 101: 177–194.
59. Tolstken DL, Rude TH, Johnston SA, Durack DT, Perfect JR (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol* 175: 1405–1411.
60. Kwon-Chung KJ (1976) Morphogenesis of *Fibronella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 68: 821–833.
61. Chang YC, Wicks BL, Kwon-Chung KJ (1995) Further analysis of the GAP59 locus of *Cryptococcus neoformans*: structure defined by forced expression and description of a new ribosomal protein-encoding gene. *Gene* 167: 179–183.
62. Zaragoza O, Casadevall A (2004) Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* 6: 10–15.
63. Casadevall A, Mukherjee J, Devi SJ, Schneerson R, Robbins JB, et al. (1992) Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. *J Infect Dis* 165: 1086–1093.
64. Zaragoza O, Alvarez M, Tebak A, Rivera J, Casadevall A (2007) The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect Immun* 75: 2729–2739.



MINIREVIEW

Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*

Rocío García-Rodas & Oscar Zaragoza

Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence: Oscar Zaragoza, Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 822 35 84; fax: +34 91 509 79 19; e-mail: ozaragoza@isciii.es

Received 15 July 2011; revised 26 August 2011; accepted 3 September 2011.
Final version published online 10 October 2011.

DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00871.x

Editor: Richard Marconi

Keywords

Cryptococcus neoformans; phagocytosis; macrophages; intracellular pathogenesis.

Abstract

After inhalation of infectious particles, *Cryptococcus neoformans* resides in the alveolar spaces, where it can survive and replicate in the extracellular environment. This yeast has developed different mechanisms to avoid internalization by phagocytic cells, the main one being a polysaccharide capsule around the cell body, which inhibits the uptake of the yeast by macrophages. In addition, capsule-independent mechanisms have also been described, such as the production of antiphagocytic proteins. Despite these mechanisms, phagocytosis can occur in the presence of opsonins, and once *C. neoformans* is internalized, multiple outcomes are possible, including pathogen killing or intracellular replication and escape from macrophages. For this reason, *C. neoformans* is considered a facultative intracellular pathogen. As alveolar macrophages are the first component of the host immune system to confront *C. neoformans*, the outcome of this interaction could determine the degree of infection, producing either a severe disseminated disease or a latency state. In this review, we will tackle the complexity of the interaction between *C. neoformans* and macrophages, including the phagocytic avoidance mechanisms and all the possible outcomes that have been described for this interaction. Finally, we will discuss the consequences of the different outcomes for the type of infection produced in the host.

Introduction

Cryptococcus neoformans is an encapsulated, ubiquitous environmental yeast that causes opportunistic life-threatening meningoencephalitis mainly in immunocompromised patients, although infections have also been described in immunocompetent individuals (Lui *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Carniato *et al.*, 2009; El Ouazzani *et al.*, 2009; Heitman *et al.*, 2011). It is believed that humans inhale desiccated yeast cells or spores (Giles *et al.*, 2009; Velagapudi *et al.*, 2009) and usually develop an asymptomatic infection limited to the lung. However, in patients with impaired immunity (in particular, in HIV patients), extrapulmonary dissemination to the central nervous system can occur, with meningoencephalitis being the most common clinical presentation (Casadevall & Perfect, 1998; Heitman *et al.*, 2011). The incidence of cryptococcosis is nowadays particularly dramatic in developing countries, because it has been estimated that it causes around 650 000 deaths and around 1 000 000

people are infected every year (Park *et al.*, 2009), which makes *C. neoformans* the fungus with the highest worldwide-associated mortality.

Alveolar macrophages represent the first line of defence against inhaled microorganisms (Mansour & Levitz, 2002). Potential functions of these cells against *C. neoformans* include phagocytosis, killing, polysaccharide sequestration, cytokine and chemokine production and antigen presentation (Levitz, 1994). *In vitro* experiments have demonstrated that the capsule has antiphagocytic properties and that phagocytosis is completely dependent on the presence of opsonins (see McQuiston & Del Poeta, 2011). In animal models, after a few hours of infection with *C. neoformans*, a large proportion of yeast cells are found within phagocytic cells, and both macrophages and neutrophils have been shown to be capable of killing these yeasts (Vecchiarelli *et al.*, 1994). But although it would be expected that this would result in complete clearance of the pathogen, there is increasing evidence that *C. neoformans* has developed a variety

of mechanisms to avoid killing by macrophages and thus to be considered a facultative intracellular pathogen. In addition, several studies describe that macrophage-depleted mice challenged with *C. neoformans* live longer than animals with no alteration in the number of macrophages (Kechichian *et al.*, 2007), which suggests that macrophages could play a detrimental role during cryptococcosis. Besides, it has been shown that phagocyte depletion reduces fungal dissemination (Shao *et al.*, 2005; Charlier *et al.*, 2009).

The outcome of the interaction between human or murine macrophages and cryptococci is very complex and involves processes that could be considered as macrophage responses, aimed to clear the pathogen (such as macrophage fusion after division), and some others that are fungal responses to avoid killing by macrophages (such as intracellular division and extrusion from macrophages) (Feldmesser *et al.*, 2001b; Tucker & Casadevall, 2002; Alvarez & Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006). The implications of phagocytosis avoidance are profound for three different reasons. First, it has a direct effect on the fungal burden in the host. Second, it provides an alternative mechanism for dissemination, because yeast cells could travel through the organism inside macrophages. And third, there is increasing evidence that *C. neoformans* can undergo a latency state that can subsequently reactivate and cause disease (Saha *et al.*, 2007). The fact that *C. neoformans* can survive within phagocytic cells has also strong implications in the establishment of this latent state.

Understanding all these strategies involved in cryptococcal survival, dissemination or latency is essential to reduce the incidence of cryptococcosis through vaccines, prophylactic antifungal therapy or therapies that could improve the efficiency of innate immunity. In this article, we will review the interaction between *C. neoformans* and phagocytic cells, including the antiphagocytic properties and how phagocytosis is achieved, and also, we will summarize the possible outcomes that have been described once the yeast is phagocytosed.

***Cryptococcus neoformans* can avoid internalization by macrophages through capsule-dependent and capsule-independent mechanisms**

Phagocytosis occurs after recognition of the pathogen by specific receptors, such as mannose receptor, scavenger receptors and others, which bind to epitopes present on the surface of the pathogen, mainly at the cell wall. In the case of *C. neoformans*, early studies demonstrated that the capsule inhibited phagocytosis (Kozel & Gotschlich, 1982). Supporting this role of the capsule, binding of iso-

lated capsular polysaccharide to capsule-free mutants conferred resistance to phagocytosis (Small & Mitchell, 1989). Thus, it is believed that the capsule acts as a physical barrier that impairs the recognition of phagocytic receptors with epitopes of the cell wall (Kozel & Gotschlich, 1982). In addition to this mechanism, capsular polysaccharide can bind to CD14 and toll-like receptors 2 and 4, producing the translocation of NF- κ B to the nucleus and consequently inhibiting the secretion of TNF α (Shoham *et al.*, 2001), which causes a deficient macrophage activation. Besides, capsular polysaccharide can induce expression of Fas ligand on the surface of macrophages, which in turn induces apoptosis of T cells (Monari *et al.*, 2005).

In the last years, new antiphagocytic mechanisms not related to the presence of the capsule have been described. One of these mechanisms depends on the secretion of the antiphagocytic protein 1 (App1). Extracellular App1 inhibits phagocytosis by binding to complement receptors CR2 and CR3 (Stano *et al.*, 2009) and thus avoids phagocytosis mediated through these receptors. Furthermore, if these receptors are not present on the macrophage surface, the antiphagocytic activity is lost (Stano *et al.*, 2009). App1 has been found in serum of infected patients, and thus, it is believed to play an important role in modulating the interaction between *C. neoformans* and macrophages. In agreement, *C. neoformans* app1 mutants are efficiently phagocytosed by alveolar macrophages (Luberto *et al.*, 2003).

Recently, a novel capsule-independent antiphagocytic mechanism based on the pleiotropic virulence determinant Gat201 has been described (Liu *et al.*, 2008; Chun *et al.*, 2011). Mutant strains lacking this protein had a basal capsule that can only be observed by immunofluorescence, and strikingly, it is efficiently phagocytosed, even better than well-known acapsular mutants, such as *cap10* (Chang & Kwon-Chung, 1999). Systematic analysis yielded two critical Gat201-bound genes, *GAT204* (a transcription factor) and *BLP1*, which account for most of the capsule-independent antiphagocytic function of Gat201. A strong correlation was observed between the quantitative effects of single and double mutants on phagocytosis *in vitro* and on host colonization *in vivo* (Chun *et al.*, 2011), and thus, it is believed that Gat201 could be a regulator of virulence because the *gat201* mutant is avirulent in mice (Liu *et al.*, 2008).

In summary, *C. neoformans* has developed multiple mechanisms that impair the internalization by phagocytic cells, some of them depending on the capsule and some others on antiphagocytic proteins and signalling pathways. For this reason, *C. neoformans* represents an excellent model to study the interaction between pathogenic microorganisms and phagocytic cells.

How is *C. neoformans* phagocytosed?

Despite the antiphagocytic mechanisms described earlier, a significant proportion of the yeast cells are found inside phagocytic cells after a few hours of infection (Feldmesser *et al.*, 2000). This finding indicates that there are mechanisms that overcome the antiphagocytic effects described earlier. So far two mechanisms have been described: opsonization with antibodies or complement, and direct interaction of the capsular polysaccharide with the phagocytic receptors that occur after capsule structure rearrangements.

Opsonin-dependent phagocytosis

Classically, there have been two opsonins that induce *C. neoformans* phagocytosis, which are antibodies and proteins from the complement system. Phagocytosis in the presence of antibodies is induced through binding of the Fc region of the Ab to the Fc receptors of the macrophages. The efficiency of antibody-dependent phagocytosis depends on multiple factors, such as the Ab isotype and the binding pattern to the capsule (Nussbaum *et al.*, 1997; Cleare & Casadevall, 1998; Cleare *et al.*, 1999). The other opsonins involved in *C. neoformans* phagocytosis are proteins from the complement system. The capsule of *C. neoformans* strongly induces complement activation through the alternative pathway, resulting in deposition of C3b on the capsule (Kozel & Pfrommer, 1986; Kozel *et al.*, 1989), which induces phagocytosis through the complement receptors (CR), in particular CR3 (Taborda & Casadevall, 2002; Zaragoza *et al.*, 2003). Encapsulated cells and purified glucuronoxylomannan (GXM, the major component of the polysaccharide capsule) induce C3 release from peritoneal cells, and the amount of released C3 correlates with the degree of encapsulation of the cell (Blackstock & Murphy, 1997). However, C3 binding to the capsule is not always opsonic, because there are *C. neoformans* strains that are not phagocytosed in the presence of complement. Several findings suggest that the efficiency of complement-mediated phagocytosis depends on the size of the cryptococcal capsule (Zaragoza *et al.*, 2009). Early studies reported an inverse correlation between complement-mediated phagocytosis and capsule size (Mitchell & Friedman, 1972; Kozel *et al.*, 1996) based on the finding that cells with large capsule bound a lower amount of C3, which suggests that cells with large capsule were less efficiently phagocytosed (Kozel *et al.*, 1996). In addition, the site of complement localization on the capsule plays an important role in determining the efficiency of phagocytosis. In cells with large capsule, complement binds in the inner regions of the capsule, in a location that is distant from the edge, and in consequence, it can-

not bind to the CR of the macrophages (Zaragoza *et al.*, 2003). Interestingly, complement localization on the capsule depends on the type of serum used to incubate the cells (Gates & Kozel, 2006), a phenomenon that could correlate with the different susceptibility to infection presented by hosts.

Phagocytosis mediated through direct interaction of the capsule with phagocytic receptors

As stated earlier, the capsule inhibits the interaction of phagocytic receptors with epitopes of the cell wall, resulting in phagocytosis avoidance. But different conditions can also trigger the interaction of the capsular polysaccharide with some receptors, such as the induction of phagocytosis by IgM antibodies. This isotype does not bind to Fc receptors, but is still opsonic for *C. neoformans*. Analysis of this phenomenon revealed that after binding of the antibodies to the capsule, polysaccharide rearrangements occur, which expose capsular epitopes that can be recognized by the CR and specifically by CD18 (Taborda & Casadevall, 2002). Interestingly, other microbial polysaccharides, such as β -glucans, can also bind to CD18 in neutrophils and NK cells, and this binding induces a prime state that enhances the cytotoxic activity of these cells against other targets that have iC3b bound on their surface (Vetvicka *et al.*, 1996). In agreement with the idea that the capsular polysaccharide can bind to phagocytic receptors, it has been found that Fab fragments, which are antibodies that lack the Fc region, are also opsonic and can induce phagocytosis through a mechanism that involves binding of the capsular polysaccharide to CR3 (Netski & Kozel, 2002).

Moreover, it has been shown that the capsular polysaccharide can also interact with FcR γ II (Monari *et al.*, 2005), which has been involved in *C. neoformans* uptake by phagocytic cells (Syme *et al.*, 2002; Monari *et al.*, 2005). However, FcR γ II engagement with capsule produces inhibitory signals that contribute to immune unresponsiveness. Besides, as stated earlier, GXM can interact with CD14 and toll-like receptors 2 and 4, which are involved in macrophage stimulation (Yauch *et al.*, 2004). Finally, in dendritic cells, it has been shown that the mannose receptor plays a key role in *C. neoformans* uptake (Syme *et al.*, 2002).

Mechanisms that allow the survival of *C. neoformans* in macrophages

Once a pathogen is internalized by phagocytes, it is contained in a new organelle called phagosome. The phagosome content and the membrane composition change through a process called maturation (see Chretien *et al.*, 2002; Russell & Gordon, 2009). As a result, lysosomes

fuse with the phagosome, forming the phagolysosome, which has an acidic pH and contains hydrolytic enzymes and high levels of free radicals which enables it to kill and digest most organic material and engulfed pathogens (Russell & Gordon, 2009).

Classically, intracellular pathogens survive or modulate the hostile environment found inside the phagolysosome. Some of them, like *Histoplasma capsulatum*, have the ability to modulate the pH of the phagosome to avoid killing (Eissenberg *et al.*, 1993). In the case of *C. neoformans*, intracellular replication was first described by Diamond and Bennet, who observed that *C. neoformans* within human macrophages replicated faster than extracellular yeast cells (Diamond & Bennett, 1973). Besides, Levitz and collaborators observed that during phagocytosis of *C. neoformans*, fusion between phagosomes and lysosomes occurred and the yeast survive in the acidic compartment (Levitz *et al.*, 1999). Interestingly, when the pH of the phagolysosome was artificially increased, there was a reduction in the intracellular proliferation of the yeast, which suggests that *C. neoformans* preferentially divides at acidic pH. In agreement, strains with increased susceptibility to acidic pH (such as mutants lacking the inositol phosphoryl

ceramide synthase 1) show reduced intracellular proliferation compared to regular strains (Luberto *et al.*, 2001). Feldmesser and collaborators performed an elegant *in vivo* study in which they followed the fate of the yeast at several times of infection (Feldmesser *et al.*, 2000). They observed that the proportion of intracellular and extracellular yeast changed during infection, so at an early time point (8 h), most of the yeasts were found intracellularly. In contrast, at later time points (16–24 h), this percentage decreased, being most of the yeasts found extracellularly. The use of real-time imaging has been a key technique to fully demonstrate the intracellular parasitism of *C. neoformans* (Fig. 1 and Supporting Information, Video S1).

Multiple mechanisms that allow intracellular survival in a diverse range of pathogens have been described, including inhibition of phagosome–lysosome fusion or escape from killing from the phagolysosome. Phagocytosis of *C. neoformans* results in the formation of large phagolysosomes (Lee *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 2009). However, it has been shown that phagolysosomes containing *C. neoformans* are leaky. Supporting this idea, holes at the phagosome membrane have been observed by electron microscopy (Tucker & Casadevall, 2002). These data

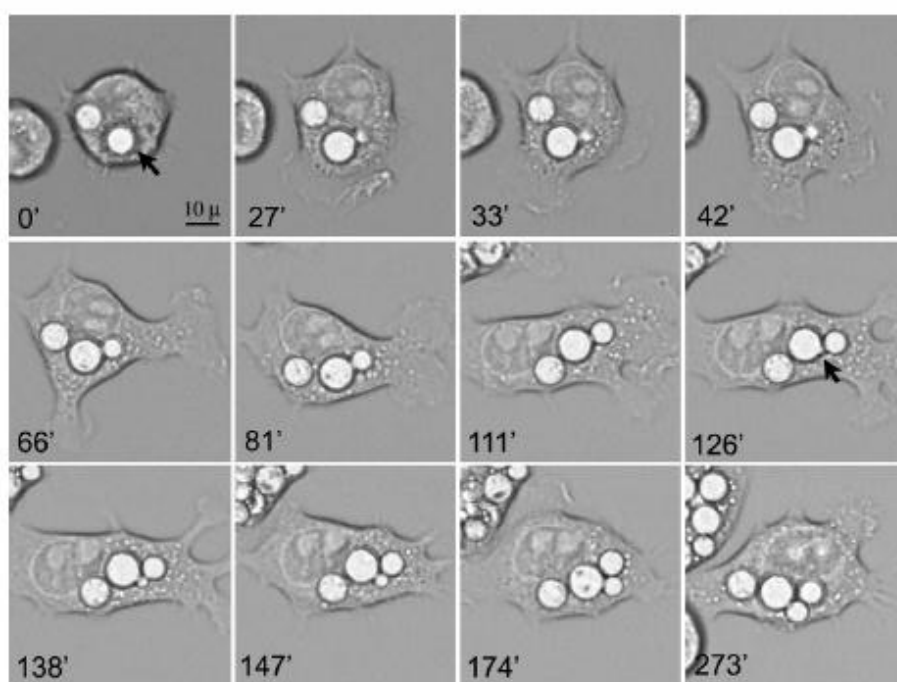


Fig. 1. Intracellular replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophage-like RAW 264.7. Two budding processes are shown in the sequence of images (see Video S1). Note that time lapse is different between panels as indicated. The scale bar shown in the first picture applies to the rest. The two arrows indicate the beginning of two consecutive budding processes.

suggest that although phagolysosome fusion occurs, *C. neoformans* has the ability to impair its functionality and thus, it is able to survive and replicate within it. Confirming this idea, intracellular *C. neoformans* cells impair the production of nitric oxide (Naslund *et al.*, 1995), which is a nitrogen-derived reactive species important to kill phagocytosed pathogens.

The main virulence factor of *C. neoformans*, the capsular polysaccharide, also plays a role in killing avoidance and interference with regular macrophage functions. Many studies have shown that this polysaccharide impairs the host immune response at multiple levels (see review in Zaragoza *et al.*, 2009). The capsule is required for intracellular survival, because acapsular mutants cannot replicate inside macrophages (Feldmesser *et al.*, 2000). After internalization of the yeast, there is an accumulation of polysaccharide-containing vesicles (Tucker & Casadevall, 2002). In addition, the formation of leaky phagolysosomes also facilitates the presence of soluble capsular polysaccharide in the cytoplasm, where it can bind to some glycolytic enzymes, such as the phosphofructokinase (Grechi *et al.*, 2011), which suggests a mechanism by which the capsular polysaccharide can interfere with the macrophage metabolism.

One of the main characteristics of the capsule is its ability to change its size according to the environmental conditions. During infection, the capsule undergoes a significant enlargement, and this increase also occurs during the interaction with macrophages (Feldmesser *et al.*, 2001a). Supporting this idea, recent findings demonstrate that macrophage extracts can also induce capsule enlargement (Chrisman *et al.*, 2011). Capsule enlargement can contribute to escape from killing, because the capsule polysaccharide has antioxidant properties (Zaragoza *et al.*, 2008). In addition, cells with enlarged capsule show decreased susceptibility to free radicals and antimicrobial peptides (Zaragoza *et al.*, 2008), which suggests that capsule enlargement protects against the stress conditions of the phagolysosome through a 'buffering' or 'trapping' mechanism. Capsule enlargement can also help to escape from killing by increasing the size of the phagolysosomes, which dilutes lysosomal contents. Moreover, Feldmesser and collaborators observed that in phagolysosomes containing highly encapsulated yeasts, there was a physical separation between the fungal cell and the phagolysosomal membrane (Feldmesser *et al.*, 2000). As many antimicrobial compounds are released from the membrane, capsule enlargement might also contribute in this way to evade the killing activity of these molecules.

Another factor that contributes to escape from killing is the fungal enzyme laccase, which localizes at the cell wall and catalyses the formation of melanin (Williamson, 1994). Melanized cells are protected against a range of

stresses, including oxygen- and nitrogen-derived oxidants and microbicidal peptides (Doering *et al.*, 1999; van Duin *et al.*, 2002; Gomez & Nosanchuk, 2003).

In addition to the capsule and melanin, antioxidant enzymes also play a role in detoxifying reactive molecules. In contrast to other systems, catalase is not the main detoxifying mechanism, because mutants lacking this enzyme show no defect in virulence and resistance to oxidative stress (Giles *et al.*, 2006). On the other hand, the glutathione system is essential for oxidative and nitrosative stress resistance (Brown *et al.*, 2007). Interestingly, mannitol production and sphingolipid synthesis seem to have a role in resistance against macrophage antimicrobial mechanisms and promotion of intracellular survival (Chaturvedi *et al.*, 1996; Giles *et al.*, 2005).

In summary, *C. neoformans* possesses multiple intrinsic mechanisms that confer resistance to the stress factors found in the phagolysosome (capsule, melanin and antioxidant enzymes). In addition, this fungus can also interfere with the phagolysosome and macrophage functions mainly through the production of extracellular capsular polysaccharide.

Possible outcomes of the interaction of *C. neoformans* and macrophages after internalization

A key technique that has allowed the elucidation of intracellular *C. neoformans* is the use of real-time imaging, and the use of it has demonstrated that *C. neoformans* survival in the macrophages can result in multiple outcomes, such as yeast replication, macrophage fusion, macrophage lysis, yeast extrusion from the phagolysosome without affecting the viability of the macrophage or even yeast transfer between two macrophages (see Voelz *et al.*, 2011). To illustrate these phenomena, we have performed a few experiments using a GFP-labelled *C. neoformans* strain, which are shown as supplemental videos. In this section, we will review these outcomes and also the factors that regulate these processes.

Fusion and division of macrophages

Although classically it has been believed that macrophages are highly differentiated cells and in consequence cannot divide, several publications indicate that these cells can undergo cell division locally in tissue under various conditions (Forbes & Mackaness, 1963; Cinatl *et al.*, 1982; Westermann *et al.*, 1989). As *C. neoformans* is a facultative intracellular pathogen, division of infected macrophages can have important consequences for the development of the infection. This issue was clearly discussed by Luo and collaborators (Luo *et al.*, 2008). Cell division multiplies the

number of phagocytic cells, which could have beneficial effects for the host by removing the fungal cells at the site of infection. But in contrast, division of infected macrophages could also enhance dissemination of infection and produce damage to the host. For this reason, distribution of the fungal cells after macrophage division and the outcome of the daughter macrophages is an interesting feature that could have implications for the outcome of this host-pathogen interaction. Luo and collaborators showed that the outcome of ingested particles distribution depends on the single phagosome formation, thus implying that phagosomal fusion events can have a dominant effect on intracellular particle distribution following phagocytic cell division (Luo *et al.*, 2008). Besides, it has been shown that after division, nascent macrophages have the ability to fuse again and originate a unique macrophage of a larger size [see Fig. 2, Video S2 and (Luo *et al.*, 2008)]. This phenom-

enon could have implications for the formation of larger and potentially more active macrophages against pathogens.

***Cryptococcus neoformans* expulsion from macrophages**

When *C. neoformans* survives inside the cells, there are mechanisms that allow the exit from macrophages, which could potentially produce an increase in the fungal burden in the tissues. Different mechanisms that produce the exit from the macrophages have been described. Multiple divisions of the yeast can produce macrophage lysis (Feldmesser *et al.*, 2001b; Del Poeta, 2004). In addition, a novel mechanism by which the yeasts exit the macrophages without killing the host cell has recently been described (Alvarez & Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006; Voelz *et al.*,

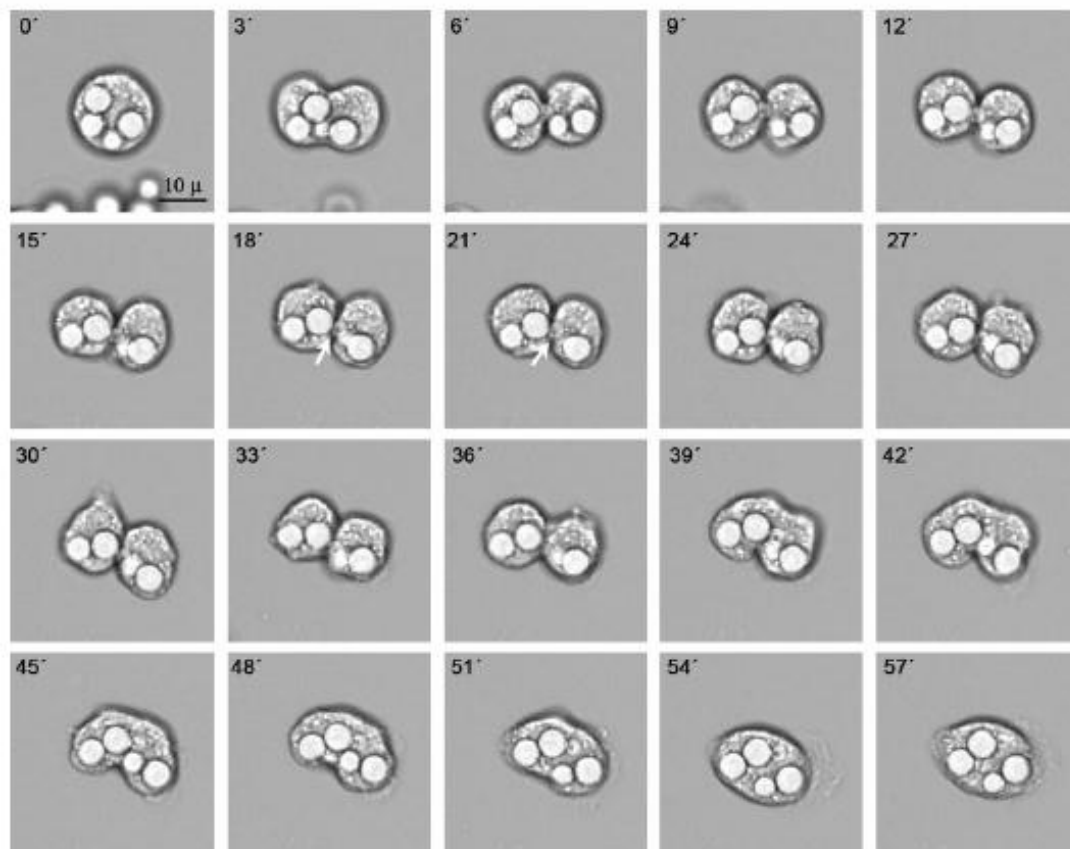


Fig. 2. Division and fusion of macrophage-like RAW 264.7 cells. The sequence of images shows division of infected macrophage (see Video S2). After cell division, a budding yeast is trapped between both of the daughter macrophage cells (see white arrows). As a result, the macrophages fuse, and *Cryptococcus neoformans* continues intracellular proliferation. The scale bar shown in the first picture applies to all the panels. The time lapse between selected pictures is 3 min as indicated in each panel.

2009). This process, called extrusion, 'vomocytosis' or nonlytic exocytosis (Fig. 3), happens in both murine and human macrophages. This type of exit can occur many hours after phagocytosis of the pathogen, but once it is triggered, it is extremely rapid, with the whole process taking < 5 min [see Fig. 3, Video S3 and (Ma *et al.*, 2006)]. Real-time imaging experiments confirmed that extrusion depends on live yeast cells (Alvarez & Casadevall, 2006). Furthermore, yeast cells opsonized with mAb were more frequently expelled than those opsonized by complement proteins (Alvarez & Casadevall, 2006). Although phagosome extrusion does not require actin rearrangements (Alvarez & Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006), recent studies have shown that actin polymerization occurs in repeated cycles around the phagosomes containing intracellular cryptococcal cells. This polymerization, which depends on the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-Arp2/3 complex, seems to inhibit cryptococcal expulsion in response to phagosome permeabilization, suggesting that it may have an important function *in vivo* in restricting the spread of the pathogen (Johnston & May, 2010). Recently, nonlytic exocytosis has been investigated using techniques based on flow cytometry (Nicola *et al.*, 2011), and it has been found that this process occurs both *in vitro* and *in vivo* in murine models.

Lateral transfer of *C. neoformans* by macrophages

Cryptococcus neoformans can also be transferred from one macrophage to another (Alvarez & Casadevall, 2007; Ma *et al.*, 2007), an event that, like expulsion, does not occur

with heat-killed cryptococci or latex beads (Alvarez & Casadevall, 2007) and that is independent of the route of yeast uptake (Ma *et al.*, 2007). In contrast to extrusion, lateral transfer is an actin-dependent process because it is inhibited by cytochalasin D (Ma *et al.*, 2007). This rare event may occur repeatedly during latent cryptococcal infections, thereby allowing the pathogen to remain concealed from the immune system and protected from antifungal agents (Ma *et al.*, 2007).

Factors that influence the different outcomes

Despite the importance of the outcome between *C. neoformans* and macrophages for disease progression, the factors that regulate the intracellular behaviour are poorly understood. Multiple studies highlight the importance of cytokine profile elicited by the host in determining the susceptibility or resistance to infection (Hoag *et al.*, 1995, 1997; Huffnagle, 1996; Beenhouwer *et al.*, 2001). The importance of Th1 immune response for controlling the cryptococcal burden is evident from the high incidence of severe *C. neoformans* infections in HIV-infected patients (Casadevall & Perfect, 1998). Cytokines play an important role in the activation of macrophages, so the cytokine profile elicited by the host could be a factor that determines the outcome of intracellular yeasts. A seminal work by Voelz and collaborators demonstrated that Th1 and Th17 cytokines reduced intracellular proliferation and yeast expulsion. In contrast, Th2 cytokines had the opposite effect (Voelz *et al.*, 2009). These findings suggest a molecular mechanism for the protective effect of Th1

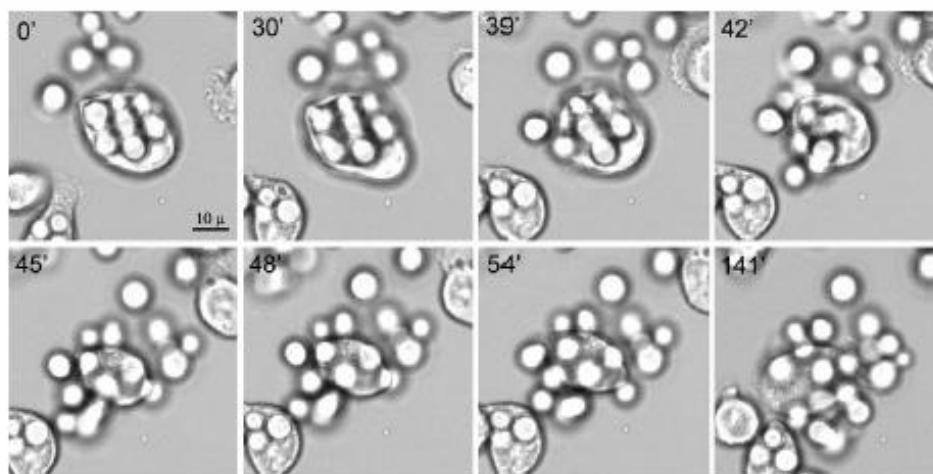


Fig. 3. Extrusion/vomocytosis of yeast cells from macrophages. Note that macrophage integrity is not damaged after cell expulsion (see Video S3). Time lapse between pictures is different as indicated in the panels. Scale bar in first picture applies to all panels.

(such as IFN- γ and TNF- α) and Th17 cytokines and for the nonprotective effect of Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 in mouse model systems (Koguchi & Kawakami, 2002). Besides, the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 have been suggested to enhance iron uptake and storage by macrophages (Weiss *et al.*, 1997). Voeltz and collaborators suggested that greater metal iron availability may increase the activity of cryptococcal virulence factors and may lead to increased intracellular proliferation in Th2-simulated cells (Voeltz *et al.*, 2009). In addition, intrinsic factors related to the macrophage could also determine the interaction with the fungus. For example, the expression of Fc and CR changes during cell cycle, which suggests that cell cycle events could influence the efficiency of phagocytosis (Luo *et al.*, 2006) and in consequence determine the number of intracellular yeasts. Nicola and collaborators have demonstrated that the addition of weak bases that increase the phagolysosomal pH (such as ammonium chloride and chloroquine) increases the rate of nonlytic exocytosis (Nicola *et al.*, 2011), indicating that conditions that lead to changes in the phagolysosomal pH can in turn affect the outcome of intracellular yeasts.

Importance and consequences of intracellular survival in the virulence of *C. neoformans*

Numerous findings indicate that the ability of *C. neoformans* to escape killing from macrophages is an important factor that contributes to the development of the disease. Supporting this notion, a correlation between the susceptibility of different hosts to cryptococcal infection and the degree of intracellular replication of the fungus was found. In contrast to mice, rats are resistant to infection (Goldman *et al.*, 1994), and a detailed comparison of the activity of rat and mouse macrophages against *C. neoformans* was performed by Shao and collaborators (Shao *et al.*, 2005). In that study, rat macrophages showed higher anti-cryptococcal activity than mouse macrophages, and they were also more resistant to lysis after intracellular infection with *C. neoformans* (Shao *et al.*, 2005). Even in the case of mice, several strains show different susceptibility to infection, and this has also been correlated with the ability of macrophages to inhibit replication of the yeast (Zaragoza *et al.*, 2007). In addition, studies with the sibling species *Cryptococcus gattii* also support that intracellular replication is an important feature for the development of the disease. This yeast can cause infection in immunocompetent individuals (see review in Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). Some isolates of this species are hypervirulent and were the causative agent of an outbreak in the Vancouver Island in the British Columbia, Canada (Kidd

et al., 2004; Bartlett *et al.*, 2011). Ma and collaborators found that these isolates had enhanced intracellular parasitism, which correlated with an increase in the mitochondrial gene expression (Ma *et al.*, 2009; Ma & May, 2010).

But the strongest evidence that intracellular replication is associated with the clinical outcome of the disease has been provided by Alanio and collaborators (Alanio *et al.*, 2011). These authors used 54 clinical isolates and compared the clinical outcome of the patients with the interaction of the isolates with phagocytic cells using flow cytometry-based techniques. They observed that specific clinical outcomes, such as the complete elimination of the fungal burden from the cerebral spinal fluid or patient death, were strongly correlated with some parameters measured *in vitro*, such as the phagocytic or intracellular replication indexes (Alanio *et al.*, 2011). This study indicates that fungal traits that determine the internalization or intracellular replication of the yeasts have profound influence on the clinical manifestations and the outcome of the patients.

In the next sections, we will review the impact of intracellular survival on several aspects of the infection, in particular in fungal replication and dissemination, and on the latent state of the infection.

Fungal replication and dissemination of *C. neoformans*

Development of cryptococcosis is attributed to both intra- and extracellular *C. neoformans* growth, and it is reasonable to think that in conditions in which there is immunodeficiency, there is an increase in the replication of the yeasts. Concerning the replication of the fungal cells internalized in macrophages, it has been suggested that their intracellular growth could exacerbate cryptococcosis (Kechichian *et al.*, 2007). In this sense, macrophage depletion has a different effect on hosts, which presents different susceptibility to infection. Shao *et al.* (2005) observed that while depletion of macrophages by treatment with liposomal clodronate in mice resulted in a reduction in the lung fungal burden, the same treatment in rats resulted in an increase in the number of yeasts found in this organ and thus correlated with macrophage resistance to lysis in response to intracellular *C. neoformans*. In agreement, a significant reduction of the fungal burden in mouse brains was found when treating them with liposomal clodronate (Kechichian *et al.*, 2007; Charlier *et al.*, 2009). All these findings provide strong evidence that the capacity of intracellular survival of *C. neoformans* has a direct impact on the fungal burden found during infection and on the dissemination of the fungus.

The ability of *C. neoformans* to escape from intracellular killing and survive inside phagocytic cells has impor-

tant consequences, not only for the increase in the fungal burden during infection but also to understand how *C. neoformans* disseminates throughout the organism and reaches other organs. In particular, the characterization of the mechanisms by which this fungus crosses the blood-brain barrier (BBB), which is a key step for the development of cryptococcal meningitis, has been of special interest. Two different processes have been described that allow dissemination: crossing of the BBB as individual cells or inside phagocytic cells. The work developed in this field supports that *C. neoformans* can in fact use both mechanisms to cross the BBB.

The first mechanism involves the crossing of biological barriers as individual cells. Recent findings using intravital microscopy have demonstrated that *C. neoformans* can in fact cross endothelia as isolated cells (Shi *et al.*, 2010). The mechanism by which individual cells cross the endothelium of the brain vasculature seems to be transcytosis. It has been shown that fungal cells can be internalized by endothelial cells and transit through the cytoplasm to emerge on the other surface (Chang *et al.*, 2004). In agreement, it has been recently shown that transcytosis is mediated by lipid rafts of the membrane of endothelial cells (Huang *et al.*, 2011).

In addition, the intracellular survival and the fact that *C. neoformans* can escape from the macrophages offer another mechanism for dissemination of the fungus. It has been suggested that *C. neoformans* can travel and cross biological membranes inside phagocytic cells, a process known as the 'Trojan Horse' dissemination model (Chretien *et al.*, 2002; Luberto *et al.*, 2003). The Trojan Horse hypothesis proposes that cryptococcal cells travel to distal tissues inside phagocytic cells, without being exposed to the immune system (Drevets & Leenen, 2000). The Trojan Horse approach was commonly accepted because of the finding of cryptococcal cells associated with phagocytic cells in the meningeal vasculature (Chretien *et al.*, 2002). But the strongest evidence that supports the Trojan Horse mechanism occurring *in vivo* was provided by Charlier *et al.* (2009), who infected animals with macrophages that had phagocytosed *C. neoformans* cells *in vitro* and observed a higher degree of dissemination compared to animals inoculated with free cryptococcal cells.

Latency and reactivation of cryptococcal infection

An important phase of the disease caused by *C. neoformans* is the persistence of the pathogen and the development of an asymptomatic latent state (see review in Dromer *et al.*, 2011). This is a significant aspect of the cryptococcal virulence, because the transition of a latent

state to a disseminated disease could be a key determinant to produce infection in conditions of immunosuppression. The mechanisms that allow the development of a latent state are still unknown. Recently, it has been described that *C. neoformans* can form giant cells, which are resistant to stress conditions, that could be involved in the survival of the host during long time periods (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). In addition, the capacity to survive inside phagocytic cells also provides a mechanism by which *C. neoformans* can evade the attack of antimicrobial compounds and other immune responses (such as other cells with killing activity) and persist in the host. One of the best models to study cryptococcal persistency and latency is rats, because, as mentioned earlier, they are resistant to infection. Although rats do not develop symptoms of acute disease, their immune system is not able to completely eradicate the infection, and *C. neoformans* cells are contained through a granulomatous response (Shao *et al.*, 2005). The number of CFUs in the lungs increases in the first days of infection, but after several weeks, it decreases and stays constant for months, without any obvious extrapulmonary dissemination. Rat alveolar macrophages seem to have an important role in this chronic infection, because more than 99% of the fungal cells are found inside epithelial cells and macrophages (Goldman *et al.*, 2000). Furthermore, reactivation of the disease in rats induced by corticosteroids (Goldman *et al.*, 2000) is accompanied by an increase in the extracellular fungal burden (Goldman *et al.*, 2000).

Latency and reactivation are likely to occur in humans. Cryptococcal antibodies are found in childhood because of initial exposure and maintained throughout adult life (Goldman *et al.*, 2001). Moreover, Goldman and co-workers found a similar pattern of antibodies in chronic pulmonary infection in a rat model (Goldman *et al.*, 2001), which supports the suitability of rat models to study the latency state of *C. neoformans* infection.

Intracellular replication in nonconventional hosts

An interesting aspect of intracellular replication of *C. neoformans* is that it also happens in phagocytic cells from nonmammalian hosts, such as insects and amoebas. The use of these other models (known as nonconventional hosts) offers several advantages, such as reduced cost, the use of large number of individuals per group and, in particular, the reduction of the bioethical problems generated by the use of mammals as experimental animals. In addition, nonconventional hosts contribute to gaining insights about virulence traits of pathogenic microorganisms. In the case of *C. neoformans*, S2 phagocytic cells from the insect *Drosophila melanogaster* and amoebas, such as

Dictyostelium discoideum and *Acanthamoeba castellanii*, have been used to study intracellular replication (Steen-

focus of multiple studies. Although in the last years, a significant advance in this field has been achieved, multi-

Interaction of *Cryptococcus neoformans* with phagocytes

157

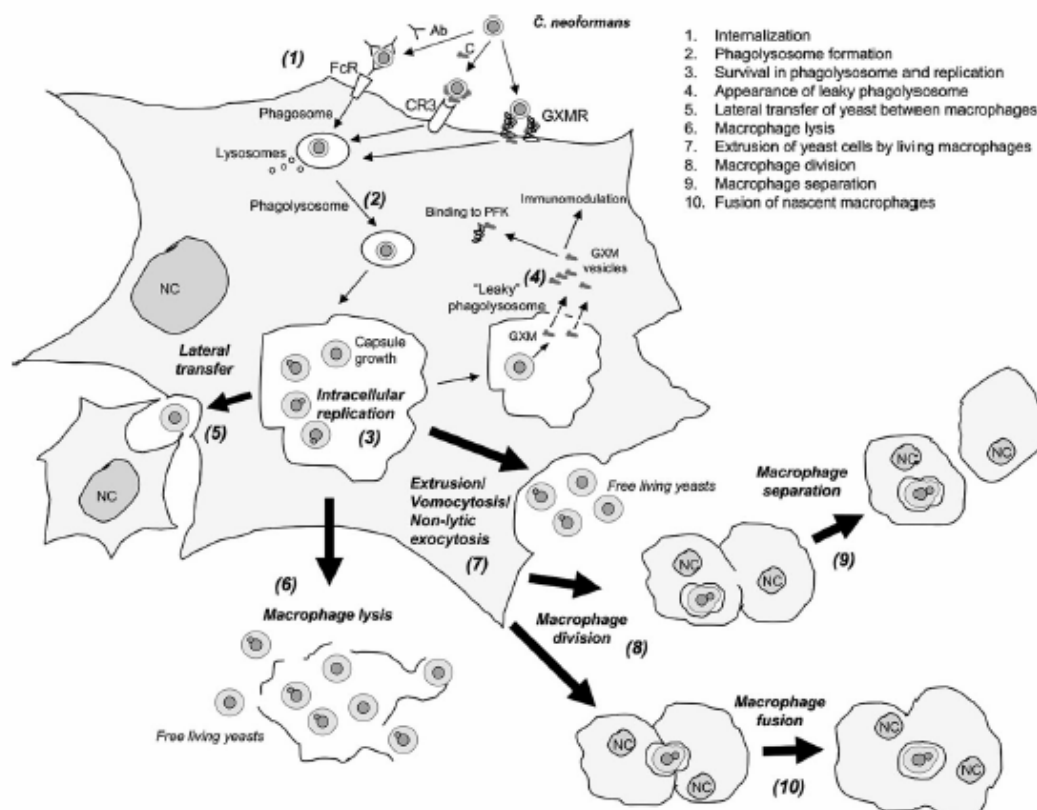


Fig. 4. Summary of the interaction between *Cryptococcus neoformans* and macrophages. Opsonized *C. neoformans* is phagocytosed through different receptors, such as Fc receptors, complement receptors and receptors that in certain conditions can recognize GXM. After internalization, *C. neoformans* is retained in phagolysosomes, where it is able to survive through several mechanisms, such as induction of capsule growth and resistance to stress conditions. Phagolysosomes containing *C. neoformans* become leaky, and multiple vesicles containing GXM are released, having different effects such as immunomodulation or binding to glycolytic enzymes, such as phosphofructokinase (PFK). *Cryptococcus neoformans* can be transferred laterally to other nearby macrophages avoiding being exposed to the immune system. But uncontrolled yeast division can cause the lysis of the macrophage, resulting in the release of yeast to the extracellular environment. Both outcomes could be involved in *C. neoformans* dissemination. However, *C. neoformans* can exit the macrophages by a process called phagosome extrusion, vomocytosis or non-lytic exocytosis. As a result, free living yeasts are released without affecting the viability of the macrophage. Finally, infected macrophages can undergo cell division, and two possible outcomes are possible, which are macrophage separation and consequently an distribution of the fungal burden between nascent macrophages, or fusion of nascent cells leading to the formation of a larger macrophage. The numbers in the figure represent the steps described in the inset and explained in this figure legend. NC, nucleus.

suitable model to study some virulence traits that can be extrapolated to other pathogens and in consequence contribute to the general understanding of fungal virulence.

Acknowledgements

We warmly thank Dr Emilia Mellado for her critical reading of the manuscript and helpful suggestions. We also thank Dr Voelz and Dr May (Birmingham University, UK) for the kind gift of the GFP-labelled strains used in

the supplemental videos of this review. R.G.-R. is supported by a FPI fellowship (reference BES-2009-015913) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. O.Z. is funded by grant SAF2008-03761 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

References

Alanio A, Desnos-Ollivier M & Dromer F (2011) Dynamics of *Cryptococcus neoformans*–Macrophage interactions reveal that

- fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. *mBio* 2: e00158-11.
- Alvarez M & Casadevall A (2006) Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16: 2161–2165.
- Alvarez M & Casadevall A (2007) Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol* 8: 16.
- Alvarez M, Bum T, Luo Y, Pirofski LA & Casadevall A (2009) The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. *BMC Microbiol* 9: 51.
- Bartlett K, Bymes E, Duncan C *et al.* (2011) The emergence of *Cryptococcus gattii* infection on Vancouver Island and expansion in the Pacific Northwest. *Cryptococcus from Human Pathogen to Model Yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 313–327. ASM press, Washington, DC.
- Beenhouwer DO, Shapiro S, Feldmesser M, Casadevall A & Scharff MD (2001) Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 69: 6445–6455.
- Blackstock R & Murphy JW (1997) Secretion of the C3 component of complement by peritoneal cells cultured with encapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 65: 4114–4121.
- Bliska JB & Casadevall A (2009) Intracellular pathogenic bacteria and fungi – a case of convergent evolution? *Nat Rev Microbiol* 7: 165–171.
- Brown SM, Campbell LT & Lodge JK (2007) *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Curr Opin Microbiol* 10: 320–325.
- Camiato A, Scotton PG, Miotti AM & Mengoli C (2009) [*Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis among apparently immunocompetent patients: description of two cases]. *Infez Med* 17: 41–45.
- Casadevall A & Perfect JR (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM press, Washington, DC.
- Chang YC & Kwon-Chung KJ (1999) Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 181: 5636–5643.
- Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, Paul-Satyaseela M, Kim KS & Kwon-Chung KJ (2004) Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood–brain barrier. *Infect Immun* 72: 4985–4995.
- Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F & Dromer F (2009) Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77: 120–127.
- Chaturvedi S & Chaturvedi V (2011) Virulence mechanisms of *Cryptococcus gattii*: convergence and divergence. *Cryptococcus from human pathogen to model yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 189–203. ASM press, Washington, DC.
- Chaturvedi V, Wong B & Newman SL (1996) Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J Immunol* 156: 3836–3840.
- Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvinseva AP, Wollenberg KK & Kwon-Chung KJ (2008) *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg Infect Dis* 14: 755–762.
- Chretien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F & Dromer F (2002) Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Infect Dis* 186: 522–530.
- Chrisman CJ, Albuquerque P, Guimaraes AJ, Nieves E & Casadevall A (2011) Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog* 7: e1002047.
- Chun CD, Brown JC & Madhani HD (2011) A major role for capsule-independent phagocytosis-inhibitory mechanisms in mammalian infection by *Cryptococcus neoformans*. *Cell Host Microbe* 9: 243–251.
- Cinatl J, Paluska E, Chudomel V, Malaskova V & Elleder M (1982) Culture of macrophage cell lines from normal mouse bone marrow. *Nature* 298: 388–389.
- Cleare W & Casadevall A (1998) The different binding patterns of two immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* serotype A and D strains correlate with serotype classification and differences in functional assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 125–129.
- Cleare W, Cherniak R & Casadevall A (1999) *In vitro* and *in vivo* stability of a *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan epitope that elicits protective antibodies. *Infect Immun* 67: 3096–3107.
- Del Poeta M (2004) Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3: 1067–1075.
- Diamond RD & Bennett JE (1973) Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages *in vitro*. *Infect Immun* 7: 231–236.
- Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK & Casadevall A (1999) Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 37: 175–181.
- Drevets DA & Leenen PJ (2000) Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect* 2: 1609–1618.
- Dromer F, Casadevall A, Perfect JR & Sorrell T (2011) *Cryptococcus neoformans*: latency and disease. *Cryptococcus from Human Pathogen to Model Yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 431–441. ASM press, Washington, DC.
- Eissenberg LG, Goldman WE & Schlesinger PH (1993) *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med* 177: 1605–1611.
- El Ouazzani H, Achachi L, Belkhir S, El Ftouh M & Fassy Fihry MT (2009) [Disseminated cryptococcosis in an apparently immunocompetent patient]. *Rev Mal Respir* 26: 788–793.
- Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P & Casadevall A (2000) *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68: 4225–4237.

- Feldmesser M, Kress Y & Casadevall A (2001a) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* **147**: 2355–2365.
- Feldmesser M, Tucker S & Casadevall A (2001b) Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **9**: 273–278.
- Forbes IJ & Mackaness GB (1963) Mitosis in macrophages. *Lancet* **41**: 1203–1204.
- García-Rodas R, González-Camacho F, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M & Zaragoza O (2011) The interaction between *Candida krusei* and Murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. *Infect Immun* **79**: 2136–2144.
- Gates MA & Kozel TR (2006) Differential localization of complement component 3 within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **74**: 3096–3106.
- Giles SS, Batinic-Haberle I, Perfect JR & Cox GM (2005) *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryot Cell* **4**: 46–54.
- Giles SS, Stajich JE, Nichols C, Gerald QD, Alspaugh JA, Dietrich F & Perfect JR (2006) The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot Cell* **5**: 1447–1459.
- Giles SS, Dagenais TR, Botts MR, Keller NP & Hull CM (2009) Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 3491–3500.
- Goldman D, Lee SC & Casadevall A (1994) Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. *Infect Immun* **62**: 4755–4761.
- Goldman DL, Lee SC, Mednick AJ, Montella L & Casadevall A (2000) Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* **68**: 832–838.
- Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski LA, Niang R & Casadevall A (2001) Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics* **107**: E66.
- Gomez BL & Nosanchuk JD (2003) Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* **16**: 91–96.
- Grechi J, Marinho-Carvalho M, Zancan P, Cinelli LP, Gomes AM, Rodrigues ML, Nimrichter L & Sola-Penna M (2011) Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. *J Biol Chem* **286**: 14820–14829.
- Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A (2011) *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast, pp. 646. ASM press, Washington, DC.
- Hoag KA, Street NE, Huffnagle GB & Lipscomb MF (1995) Early cytokine production in pulmonary *Cryptococcus neoformans* infections distinguishes susceptible and resistant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**: 487–495.
- Hoag KA, Lipscomb MF, Izzo AA & Street NE (1997) IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**: 733–739.
- Howard DH (1965) Intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol* **89**: 518–523.
- Huang SH, Long M, Wu CH, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Chi F, Lee S & Jong A (2011) Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3). *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M111.219378.
- Huffnagle GB (1996) Role of cytokines in T cell immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Biol Signals* **5**: 215–222.
- Johnston SA & May RC (2010) The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. *PLoS Pathog* **6**: e1001041.
- Kechichian TB, Shea J & Del Poeta M (2007) Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect Immun* **75**: 4792–4798.
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ & Meyer W (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *P Natl Acad Sci USA* **101**: 17258–17263.
- Koguchi Y & Kawakami K (2002) Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int Rev Immunol* **21**: 423–438.
- Kozel TR & Gotschlich EC (1982) The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol* **129**: 1675–1680.
- Kozel TR & Frommer GS (1986) Activation of the complement system by *Cryptococcus neoformans* leads to binding of iC3b to the yeast. *Infect Immun* **52**: 1–5.
- Kozel TR, Wilson MA, Farrell TP & Levitz SM (1989) Activation of C3 and binding to *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae. *Infect Immun* **57**: 3412–3417.
- Kozel TR, Tabuni A, Young BJ & Levitz SM (1996) Influence of opsonization conditions on C3 deposition and phagocyte binding of large- and small-capsule *Cryptococcus neoformans* cells. *Infect Immun* **64**: 2336–2338.
- Lee SC, Kress Y, Zhao ML, Dickson DW & Casadevall A (1995) *Cryptococcus neoformans* survive and replicate in human microglia. *Lab Invest* **73**: 871–879.
- Levitz SM (1994) Macrophage-*Cryptococcus* interactions. *Immunol Ser* **60**: 533–543.
- Levitz SM (2001) *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular? *Trends Microbiol* **9**: 417–418.
- Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA & Simons ER (1999) *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* **67**: 885–890.

- Liu OW, Chun CD, Chow ED, Chen C, Madhani HD & Noble SM (2008) Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cdl* **135**: 174–188.
- Luberto C, Toffaletti DL, Wills EA, Tucker SC, Casadevall A, Perfect JR, Hannun YA & Del Poeta M (2001) Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. *Genes Dev* **15**: 201–212.
- Luberto C, Martinez-Marino B, Taraskiewicz D *et al.* (2003) Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **112**: 1080–1094.
- Lui G, Lee N, Ip M, Choi KW, Tso YK, Lam E, Chau S, Lai R & Cockram CS (2006) Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. *QJM* **99**: 143–151.
- Luo Y, Cook E, Fries BC & Casadevall A (2006) Phagocytic efficacy of macrophage-like cells as a function of cell cycle and Fcγ receptors (FcγR) and complement receptor (CR)3 expression. *Clin Exp Immunol* **145**: 380–387.
- Luo Y, Alvarez M, Xia L & Casadevall A (2008) The outcome of phagocytic cell division with infectious cargo depends on single phagosome formation. *PLoS ONE* **3**: e3219.
- Ma H & May RC (2010) Mitochondria and the regulation of hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island. *Virulence* **1**: 197–201.
- Ma H, Croudace JE, Lammas DA & May RC (2006) Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* **16**: 2156–2160.
- Ma H, Croudace JE, Lammas DA & May RC (2007) Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunol* **8**: 15.
- Ma H, Hagen F, Stekel DJ, Johnston SA, Sionov E, Falk R, Polachek I, Boekhout T & May RC (2009) The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *P Natl Acad Sci USA* **106**: 12980–12985.
- Mansour MK & Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 359–365.
- McQuiston T & Del Poeta M (2011) The interaction of *Cryptococcus neoformans* with host macrophages and neutrophils. *Cryptococcus from Human Pathogen to Model Yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 373–387. ASM press, Washington, DC.
- Mitchell TG & Friedman L (1972) *In vitro* phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **5**: 491–498.
- Monari C, Bistoni F, Casadevall A, Pericolini E, Pietrella D, Kozel TR & Vecchiarelli A (2005) Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *J Infect Dis* **191**: 127–137.
- Naslund PK, Miller WC & Granger DL (1995) *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infect Immun* **63**: 1298–1304.
- Netski D & Kozel TR (2002) Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity. *Infect Immun* **70**: 2812–2819.
- Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski Lda S & Casadevall A (2011) Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs *in vivo* and is influenced by phagosomal pH. *mBio* **2**: e00167–11.
- Nussbaum G, Cleare W, Casadevall A, Scharff MD & Valadon P (1997) Epitope location in the *Cryptococcus neoformans* capsule is a determinant of antibody efficacy. *J Exp Med* **185**: 685–694.
- Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chretien F, Heitman J, Dromer F & Nielsen K (2010) Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* **6**: e1000953.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG & Chiller TM (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **23**: 525–530.
- Qin QM, Luo J, Lin X, Pei J, Li L, Ficht TA & de Figueiredo P (2011) Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **7**: e1002078.
- Russell DG & Gordon S (2009) *Phagocyte-Pathogen Interactions. Macrophages and the Host Response to Infection*. ASM press, Washington, DC.
- Saha DC, Goldman DL, Shao X *et al.* (2007) Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* **14**: 1550–1554.
- Shao X, Mednick A, Alvarez M, van Rooijen N, Casadevall A & Goldman DL (2005) An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *J Immunol* **175**: 3244–3251.
- Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, Kubes P & Mody CH (2010) Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest* **120**: 1683–1693.
- Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT & Levitz SM (2001) Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* **166**: 4620–4626.
- Small JM & Mitchell TG (1989) Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infect Immun* **57**: 3751–3756.
- Srikanta D, Yang M, Williams W & Doering TL (2011) A sensitive high-throughput assay for evaluating host-pathogen interactions in *Cryptococcus neoformans* infection. *PLoS ONE* **6**: e22773.
- Stano P, Williams V, Villani M, Cymbalyuk ES, Qureshi A, Huang Y, Morace G, Luberto C, Tomlinson S & Del Poeta M (2009) App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2. *J Immunol* **182**: 84–91.
- Steenbergen JN, Shuman HA & Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic

- strategy in macrophages. *P Natl Acad Sci USA* **98**: 15245–15250.
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD & Casadevall A (2003) *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* **71**: 4862–4872.
- Syme RM, Spurrell JC, Amankwah EK, Green FH & Mody CH (2002) Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fcγ receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infect Immun* **70**: 5972–5981.
- Taborda CP & Casadevall A (2002) CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity* **16**: 791–802.
- Tucker SC & Casadevall A (2002) Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *P Natl Acad Sci USA* **99**: 3165–3170.
- van Duin D, Casadevall A & Nosanchuk JD (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3394–3400.
- Vecchiarelli A, Dottorini M, Pietrella D, Monari C, Retini C, Todisco T & Bistoni F (1994) Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**: 130–137.
- Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR & Heitman J (2009) Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 4345–4355.
- Vetvicka V, Thornton BP & Ross GD (1996) Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest* **98**: 50–61.
- Voelz K, Lammas DA & May RC (2009) Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 3450–3457.
- Voelz K, Johnston SA, Rutherford JC & May RC (2010) Automated analysis of cryptococcal macrophage parasitism using GFP-tagged cryptococci. *PLoS ONE* **5**: e15968.
- Voelz K, Johnston SA & May RC (2011) Intracellular replication and exit strategies. *Cryptococcus from Human Pathogen to Model Yeast* (Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR & Casadevall A, eds), pp. 441–451. ASM press, Washington, DC.
- Weiss G, Bogdan C & Hentze MW (1997) Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* **158**: 420–425.
- Westermann J, Ronneberg S, Fritz FJ & Pabst R (1989) Proliferation of macrophage subpopulations in the adult rat: comparison of various lymphoid organs. *J Leukoc Biol* **46**: 263–269.
- Williamson PR (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* **176**: 656–664.
- Woods JP (2003) Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **6**: 327–331.
- Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB & Levitz SM (2004) Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect Immun* **72**: 5373–5382.
- Zaragoza O, Taborda CP & Casadevall A (2003) The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol* **33**: 1957–1967.
- Zaragoza O, Alvarez M, Telzak A, Rivera J & Casadevall A (2007) The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect Immun* **75**: 2729–2739.
- Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL & Casadevall A (2008) Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* **10**: 2043–2057.
- Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E & Casadevall A (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* **68**: 133–216.
- Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL & Casadevall A (2010) Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog* **6**: e1000945.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Video S1. Intracellular replication.

Video S2. Macrophage division and fusion.

Video S3. Yeast extrusion from infected macrophages.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Galleria mellonella as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*

Luciana Thomaz,^{1,*} Rocío García-Rodas,² Allan J. Guimarães,^{3,†} Carlos P. Taborda,¹ Oscar Zaragoza² and Joshua D. Nosanchuk³

¹Institute of Biomedical Science; Department of Microbiology; University of São Paulo; São Paulo, Brazil; ²Mycology Reference Laboratory; National Centre for Microbiology; Instituto de Salud Carlos III; Madrid, Spain; ³Departments of Medicine and Microbiology and Immunology; Albert Einstein College of Medicine; Bronx, NY USA

[†]Current affiliation: Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes; Department of Immunology; Federal University of Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, Brazil

Keywords: *Galleria mellonella*, *Paracoccidioides lutzii*, *Histoplasma capsulatum*, infection model, fungal pathogenesis

Non-mammalian models have been used to investigate fungal virulence. In this work we have explored the use of *Galleria mellonella* as an infection model for the pathogenic dimorphic fungi *Histoplasma capsulatum* and *Paracoccidioides lutzii*. In mammalian models these fungi cause similar infections, and disease outcomes are influenced by the quantity of the infective inocula. We describe a similar aspect in a *G. mellonella* model and characterize the pathogenesis features in this system. Infection with *P. lutzii* or *H. capsulatum*, in all inoculum used, killed larvae at 25 and 37°C. However, there was a lack of correlation between the number of yeast cells used for infection and the time to larvae death, which may indicate that the fungi induce protective responses in a dynamic manner as the lowest concentrations of fungi induced the most rapid death. For both fungi, the degree of larvae melanization was directly proportional to the inocula size, and this effect was visibly more apparent at 37°C. Histological evaluation of the larvae showed a correlation between the inoculum and granuloma-like formation. Our results suggest that *G. mellonella* is a potentially useful model to study virulence of dimorphic fungi.

Introduction

Invertebrates have increasingly been viewed as a valid model for studying the virulence of human pathogens because of the similarities in the basic innate immune systems between these non-vertebrate hosts and mammals.^{1–3} Furthermore, microbial virulence mechanisms, especially of environmental opportunistic pathogens, are likely conserved among different pathogens as these microbes often have evolved and maintained their virulence through interactions with a diverse range of environmental predators such as amoeba or nematodes.^{4–6} However, some fungi are found free-living in soil and do not require hosts for replication and survival, and it has been proposed that their virulence factors required for mammalian infection emerged as a result of selection in the soil by interactions with environmental competitors.⁷ Popular non-vertebrate hosts for virulence studies of human pathogenic fungi include the nematode *Caenorhabditis elegans*,^{8–11} the fruit fly *Drosophila melanogaster*^{12–14} and the greater wax moth *Galleria mellonella*.^{15–18}

Larvae of *G. mellonella* are inexpensive to keep, easy to manipulate and their use may reduce the need for pathogenicity testing in mammals, with a concomitant reduction in potential mammalian suffering.^{15,19} The immune response of insects such as *G. mellonella* is similar to that of mammals, which consists of

structural and passive barriers, and generates cellular responses via hemocytes within the hemolymph. Antimicrobial peptides play a crucial role in fighting against pathogens in insects because they lack adaptive immune system.²⁰

The greater wax moth has previously been used to examine traits associated with the pathogenicity of diverse bacterial species, including wild-type and lipopolysaccharide deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa*²¹ as well as strains of *Proteus mirabilis*,²² *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*.^{21,23} Moreover, *G. mellonella* is an effective host model to study fungal pathogenesis. For example, *G. mellonella* has been used to investigate the role of filamentation²⁴ and β -glucans²⁵ in *Candida albicans*. This is especially important as *C. albicans* virulence in *G. mellonella* has been shown to correlated with disease in mice.¹⁸ *G. mellonella* has also been used to study the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*,¹⁶ *Microsporium gypseum* and *Trichophyton rubrum*,²⁶ *Aspergillus flavus*²⁷ and *A. fumigatus*.¹⁵ Moreover, *C. neoformans* morphological changes during infection in mice correlate with those found in *G. mellonella*; hence, *G. mellonella* has been validated as an alternative model host for the study of *C. neoformans* virulence and pathogenicity.²⁸

Endemic deep or systemic mycoses are common in specific geographical areas of the world. Paracoccidioidomycosis (PCM)

*Correspondence to: Luciana Thomaz; email: lucithomaz@usp.br
Submitted: 05/17/12; Revised: 11/21/12; Accepted: 11/28/12
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.23047>

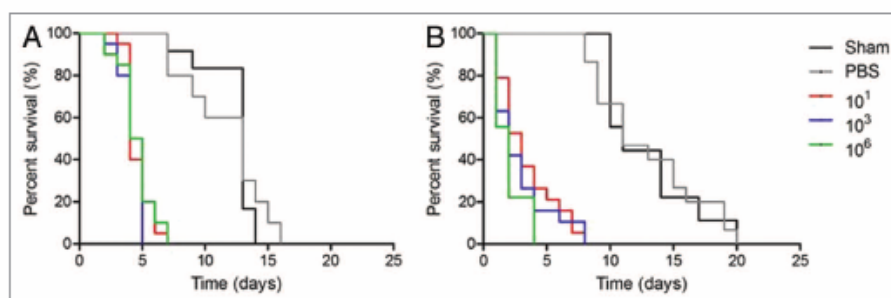


Figure 1. Log-Rank plots of the survival of *G. mellonella* after infection with different concentrations of *P. lutzii* yeast cells. *G. mellonella* infected and incubated at (A) 25°C or (B) 37°C. Controls included uninfected larva (Sham) and larva injected with PBS. *n* = 40 larvae per group.

and histoplasmosis are prevailing examples in tropical regions. *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* (formerly *P. brasiliensis* isolate 01 and recently designated as a separate species based on phylogenetic differences²⁹) are thermally dimorphic fungi that cause PCM, the most prevalent systemic mycosis in several countries of Latin America, including Brazil, Argentina, Venezuela and Colombia. PCM represents the major cause of disability and death among young adult rural workers during their most productive stage of life. PCM is the tenth most prevalent fatal chronic infectious diseases in Brazil, and is the systemic mycosis with highest mortality rate in Brazil.³⁰ In fact, a survey of records from 1996–2006 shows that paracoccidioidomycosis was the main cause of death among systemic mycoses in Brazil, followed by cryptococcosis, candidiasis and histoplasmosis³¹ Histoplasmosis is caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Although it is highly endemic in tropical climate zones in Central America, South America and in the Ohio and Mississippi River valleys in the USA, histoplasmosis is a global problem with more than 60 countries reporting the disease. Histoplasmosis is the most prevalent cause of fungal respiratory infections in the USA, with an estimated 500,000 individuals acquiring the fungus annually. A national survey of hospital discharge diagnoses from 2002 identified 3,370 patients hospitalized for histoplasmosis in the US with a crude mortality rate of 8%.³²

In the present study, we have investigated the capacity of *G. mellonella* to serve as a model host to assess the virulence of *P. lutzii* and *H. capsulatum* at environmental (25°C) and physiological (37°C) temperatures. We evaluated the survival of the larvae when infected with different inocula and we verified the presence of granulomas in the tissue of the larvae by histopathology. Our results demonstrate that these fungal pathogens can cause significant disease in *G. mellonella*. Our findings indicate that *G. mellonella* can be used as a host model to study virulence of dimorphic fungal pathogens.

Results

Survival of *G. mellonella* after infection with *P. lutzii* and *H. capsulatum*. The dimorphic fungi, *P. lutzii* strain Pb01 and

H. capsulatum strain G184AR, killed *G. mellonella* larvae at 25 and 37°C. However, there was a lack of correlation between the inocula size and the time to death. Each concentration of *P. lutzii* and of *H. capsulatum* G184AR tested significantly reduced the survival of *G. mellonella* compared with sham or PBS infected larvae (Figs. 1 and 2).

For *P. lutzii* at 25°C or 37°C, all inocula were lethal ($p < 0.0001$ compared with PBS and Sham) with median survival of 3 and 2 d, respectively (Fig. 1A and B). Figure 1A shows that challenges with 10^3 *P. lutzii* yeast cells resulted in the most rapid death, although this was not a significant increase relative to the other inoculums tested ($p > 0.05$). Figure 1A and B depict one concentration for each group (10^1 , 10^3 and 10^6) in one representative experiment. For all groups tested at 25°C, the lowest (10^1 and 10^2), the middle (10^3 and 10^4) and the highest (10^5 and 10^6) number of yeast cells uniformly killed all larvae by day 5–7. For *P. lutzii* at 37°C (Fig. 1B), infection the higher inocula groups (10^5 and 10^6) was more rapidly lethal compared in the lowest (10^1 and 10^2) and middle doses (10^3 and 10^4) ($p < 0.05$). At 37°C, each inocula of *P. lutzii* killed all the larvae by day 4–8.

Cultivation of the larvae at 37°C did not enhanced the lethality of 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 or 10^5 cells of *P. lutzii* per larvae relative to 25°C ($p > 0.05$). However the inoculum of 10^6 at 37°C (Fig. 2B) was more lethal than at 25°C ($p = 0.0001$). For both temperatures, the most rapid rate of death occurred in the middle inocula groups, and the concentration 10^3 was more lethal at 25°C ($p = 0.327$). Nevertheless, the median survival time in aggregate for the infected larvae at both 25°C and 37°C was 6 d.

Similar to the infections with *P. lutzii* at 25°C, all concentrations of *H. capsulatum* G184AR killed the larvae more rapidly relative to controls ($p < 0.001$ compared with PBS and Sham) with a median survival of 7 d (Fig. 2A). The most rapid lethality occurred with 10^1 and 10^2 *H. capsulatum* and these inocula were significantly more virulent than the other challenge doses ($p < 0.0001$). There was a trend for the highest challenges (10^5 and 10^6) to be the second most lethal. At 37°C, there were fewer differences between the infection groups (Fig. 2B). The lower inocula groups died more slowly at 37°C compared with

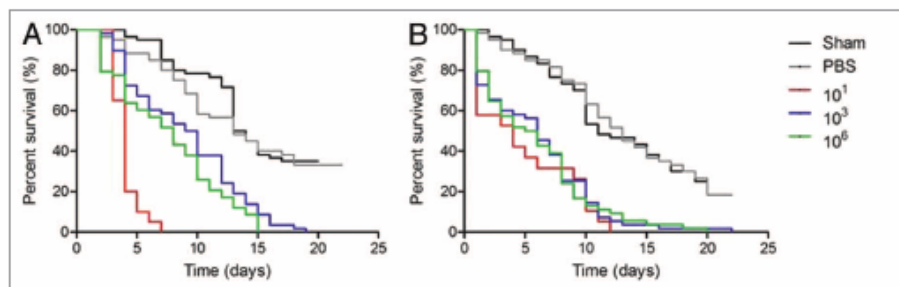


Figure 2. Log-Rank plots of the survival of *G. mellonella* after infection with different concentrations of *H. capsulatum* G184AR yeast cells. *G. mellonella* infected and incubated at (A) 25°C or (B) 37°C. Controls included uninfected larva (Sham) and larva injected with PBS. n = 60 larvae per group.

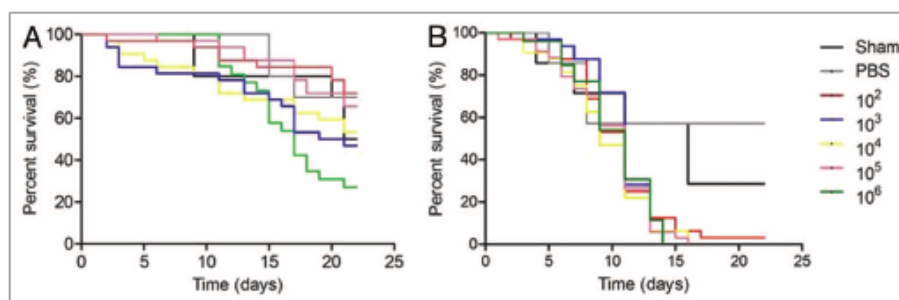


Figure 3. Log-Rank plots of the survival of *G. mellonella* after infection with different concentrations of *H. capsulatum* ATCC G217B yeast cells. *G. mellonella* infected and incubated at (A) 25°C or (B) 37°C. Controls included uninfected larva (Sham) and larva injected with PBS. n = 32 larvae per group.

25°C ($p < 0.05$). The higher temperature was significantly more lethal at the inoculum of 10^3 ($p = 0.0014$) when compared with incubation at 25°C. Figure 1A and B show the results for one concentration of inoculum for each group (10^1 , 10^3 and 10^6).

To examine whether lethality was similar across strains, we also tested survival of *G. mellonella* with *H. capsulatum* ATCC G217B (Fig. 3). Interestingly, G217B was less virulent than G184AR in our model system. At 25°C, there were no differences between any of the infected groups relative to controls ($p > 0.05$). Survival was significantly reduced for each inocula incubated at 37°C compared with the same challenged dose at 25°C ($p < 0.001$). The median survival time for the infected larvae at 37°C was 11 d and the infected groups were significantly different from insects that received PBS ($p < 0.05$).

Assessment of melanization of *G. mellonella* in response to infection. Since melanization is a key step in the antimicrobial response of *G. mellonella*, we assessed the pigmentation of the larvae after fungal challenge. Infected larvae from all groups developed varying degrees of melanization, whereas the control (PBS and Sham) larvae did not. Melanization in the infected larvae was induced within hours of challenge after infection with either *P. lutzii* or *H. capsulatum*. Responses of *G. mellonella* to *H. capsulatum* yeast cells at 6 h after infection at 25°C and 37°C are shown in Figures 4 and 5, respectively. The melanization was

more pronounced at 37°C. At both temperatures, the intensity of pigment formation correlated with the number of inoculated yeast cells. Similar results occurred after infection with *P. lutzii* (data not shown).

***G. mellonella* histopathological evaluation.** To further understand the fate of *P. lutzii* inoculated into *G. mellonella*, infected larvae were fixed in formalin and processed for histopathology. Figures 6 and 7 show PAS-stained sections of uninfected and infected larvae incubated at 25°C and 37°C. *P. lutzii* induced histopathological changes in *G. mellonella*, and yeast cells were observed in sections from infected larvae. There was evidence of tissue integrity damage in the infected larvae and pigmented nodules and granulomas were associated with yeast cells. Microscopically, we observed more yeast cells at 25°C (Fig. 6) compared with those at 37°C (Fig. 7). The presence of granulomas-like containing yeast in the tissue of the larva was also confirmed by counting the nodules using Image-Pro-Plus, at 25°C and 37°C (Fig. 8). Additionally, the number of granulomas-like paralleled the inoculum density at both temperatures. More yeast cells were visualized in the insects that received higher inocula (10^5 and 10^6) at 25°C relative to 37°C ($p = 0.0027$). In the other inocula, the lower and intermediate, there was no statistical difference. Although *P. lutzii* can undergo morphogenesis at room temperature, no hyphae or mycelia structures were detected

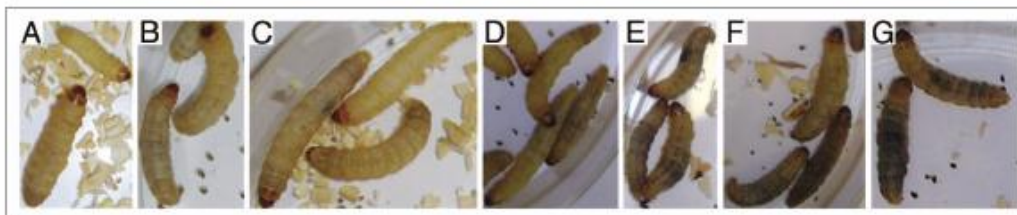


Figure 4. Infection of *G. mellonella* with *H. capsulatum* G184AR yeast cells induces melanization of the larva in a dose dependent manner. Larvae were injected with (A) PBS, (B) 10^1 , (C) 10^2 , (D) 10^3 , (E) 10^4 , (F) 10^5 or (G) 10^6 colonies of *H. capsulatum*/larvae. The images were taken 6 h after infection at 25°C.



Figure 5. Infection of *G. mellonella* with *H. capsulatum* G184AR yeast cells induces melanization of the larva in a dose dependent manner. Larvae were injected with (A) PBS, (B) 10^1 , (C) 10^2 , (D) 10^3 , (E) 10^4 , (F) 10^5 or (G) 10^6 colonies of *H. capsulatum*/larvae. The images were taken 6 h after infection at 37°C.

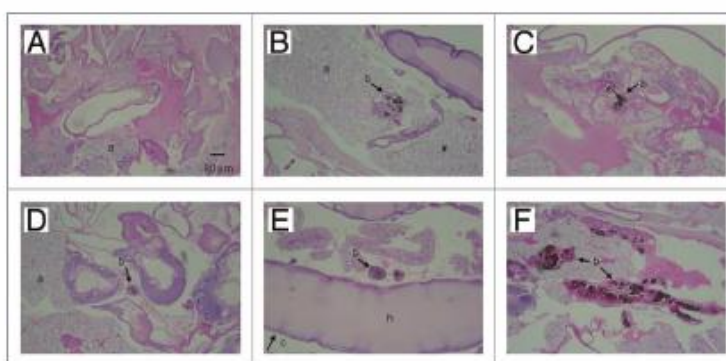


Figure 6. PAS-stained sections of *G. mellonella*. (A) Uninfected control larva inoculated with 0.1 M PBS. Larva infected with *P. lutzii* at concentrations of (B) 10^1 , (C) 10^2 , (D) 10^3 , (E) 10^4 and (F) 10^6 colony forming units. All larva were incubated at 25°C. Structures are annotated as follows: a, adipose bodies; b, fungal cells; c, cuticle; h, hemolymph.

in infected larvae incubated at 25°C over the 3 d incubation point examined. No nodules or granulomas-like were detected in the uninfected control larvae.

Colony forming units (CFU). Despite plating onto antibiotic agar, no *P. lutzii* were recovered from the plates. In all experiments, non-*P. lutzii* molds contaminated all plates after 2 weeks.

Discussion

We assessed the virulence of the dimorphic fungus *P. lutzii* and *H. capsulatum* in a *G. mellonella* model using different inocula

at two different temperatures. At 25°C in the laboratory and in their environmental niches, these fungi exist in mycelium forms, and undergo a morphogenic transition to yeast forms at 37°C, which is the characteristic pathological forms in mammalian hosts. Survival analysis of *G. mellonella* larvae challenged with different inoculums of both yeast showed that *P. lutzii* and *H. capsulatum* G184AR strain are lethal to the insect. In the first 4–7 d after infection half of the all insects died. However, there was not a positive correlation between increased densities of the yeast cells used in infection with a more rapid time to death, except for *P. lutzii* at 37°C at which the highest doses killed more rapidly.

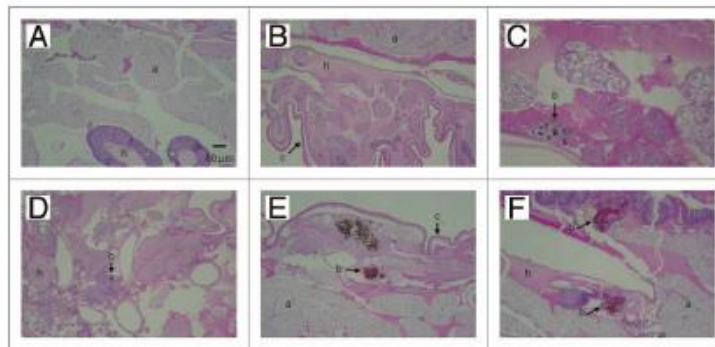


Figure 7. PAS-stained sections of *G. mellonella*. (A) Uninfected control larva inoculated with 0.1 M PBS. Larva infected with *P. lutzii* at concentrations of (B) 10^1 , (C) 10^2 , (D) 10^3 , (E) 10^4 and (F) 10^6 colony forming units. All larva were incubated at 37°C . Structures are annotated as follows: a, adipose bodies; b, fungal cells; c, cuticle; h, hemolymph.

Melanization in *G. mellonella* is due to activation of phenoloxidase in the hemolymph.³³ In our experiments, we detected significant melanization in groups of larvae within 6 h of infection. The process of melanization is key to the insect's defense against a wide range of pathogens, such as *Aspergillus* spp.,³⁴ *C. albicans*³⁵ and *C. neoformans*.¹⁰ The melanization process is intended to encapsulate the invading pathogen within the pigment. The visual observation of the melanization of the *G. mellonella* body in all concentrations used showed that the higher inoculums induced more rapid melanization (Figs. 4 and 5). It is even possible that infection with lower amounts of the fungi avoided early triggering of this response, allowing the pathogens to more readily proliferate. This is consistent with a dynamic response by the insect³⁶ to the quantity of these fungal pathogens. However, it is clear that triggering of the melanization response is insufficient to combat these fungi, especially given the observation that the heavily melanized larva infected with *H. capsulatum* G184AR at 37°C succumbed to infection. Interestingly, a melanin-deficient *A. fumigatus* mutants that triggered enhanced *G. mellonella* melanization displayed increased virulence in the insect.³⁴ Hence, the activation of melanization may be either insufficient to combat infection or even potentiate host damage, perhaps by blocking cellular processes or increasing the rigidity of the insect.

The immune response of the *G. mellonella* may differ when the larvae are incubated at 25°C and 37°C . In Figures 6 and 7 we show differences between the formations of the granulomas-like. Notably, the histopathologic analyses reveal that *G. mellonella* granulomas-like have similarities with the granulomas associated with paracoccidioidomycosis infection in mammals.^{37,38} The amount of melanin detected correlated with the degree of melanization of the insects, which also corresponded to the increased numbers of yeast cells observed in the insects challenged with the highest density inocula.

We compared the virulence of two wild-type strains of *H. capsulatum*. G184AR is RFLP class III, while G217B is RFLP class II.³⁹ Interestingly, G184AR was more virulent at both 25°C and 37°C , while G217B was severely attenuated at 25°C . *G. mellonella*

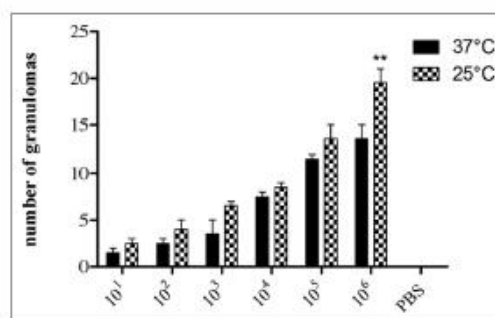


Figure 8. Number of granulomas containing yeast cells of *P. lutzii* as visualized microscopically on histology slides. PAS-stained sections of *G. mellonella* were counted using Image-Pro-Plus. The graphs represent the infected insects incubated at 25°C or 37°C . The control shown is insects injected with PBS. ** $p = 0.0027$ comparing two temperatures.

has a pathogen recognition protein that recognizes β -glucan.⁴⁰ G184AR blocks the interaction of cell surface β -glucan with mammalian dectin-1 by displaying an α -glucan layer over the β -glucans.⁴⁰ In contrast, G217B lacks α -glucans on the fungal cell surface, which unmasks β -glucans for interaction with *G. mellonella* recognition proteins. Future studies using wild-type G184AR and yeast cells in which α -glucan has either been disrupted or silenced may provide further information regarding this process.

Hyphal transformation of either yeast species over the course infection at 25°C was not visualized. This was not surprising as transformation of *Paracoccidioides* sp in medium specific for transformation, such as MMCM, requires several weeks to achieve switching of yeast cells into mycelia growth. Future studies will investigate whether infection with conidia results in mycelia growth or the transformation to yeast forms at either temperature. We also tried to isolate viable yeast of *P. lutzii* and

H. capsulatum after 24, 48 and 72 h of the infection, using the protocol described in reference 41; however, the plates were contaminated despite harvesting the larvae in a laminar flow hood. Notably, plating of homogenates from control uninfected *G. mellonella* also resulted in similar contaminants, suggesting that these insects have fungi as a component of their normal flora.^{42,43}

Our findings with *H. capsulatum* and *P. lutzii* are consistent with the growing literature on the use of insect models to study fungal pathogenesis. The dynamic of lethality that we observed with our high, middle and low doses suggests that dimorphic fungi may be useful in characterizing new information about the response of *G. mellonella* to pathogenic challenge. The results using two different strains of *H. capsulatum* indicate that this model may be an effective system for screening isolates for virulence as well as for assessing changes in virulence after disruption of or interference with fungal processes. In summary, *G. mellonella* is potentially useful model to study and compare virulence of dimorphic fungi. Moreover, these organisms may serve as a useful platform for further studies to dissect the relative role of melanin in defense vs. injury in this insect species.

Materials and Methods

Strain and growth conditions. *H. capsulatum* strain G184ARAR (ATCC 26027) and ATCC G217B (ATCC 26032; virulent strain lacking α -glucan on the yeast cell surface) and *P. lutzii* strain Pb01 (from Dr. George Deepe) yeast cells were grown in Sabouraud broth (BD Difco Bacto) at 37°C for 3 d. Cells were collected and washed the concentration determined by counting using a hemocytometer and the viability assessed by 0.4% Trypan Blue exclusion, to increase reproducibility. *Galleria mellonella* larvae wax-moth in the final instar larval stage (Vanderhorst Wholesale, Inc.) were selected that were similar in size and weighed 0.10–0.15 g. Prior to use, the insects were without any external gray markings. The larvae were incubated at 4°C for 30 min before the infection to impede movement in order to facilitate infection. Twenty larvae per group were inoculated by injecting 10 μ l containing different inoculums of *H. capsulatum* or *P. lutzii* (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6) diluted in sterile PBS into the hemocoel through the last proleg as described previously.⁴⁴ The inoculations were performed with a Hamilton syringe with a needle diameter of 0.75 mm. And the needles were cleaned after all injections and between fungal strains. The same number of caterpillars was inoculated with PBS in each experiment to monitor killing due to physical injury and another group of caterpillars without any manipulation was followed in parallel as an untreated (sham) control. All larvae were placed in sterile Petri dishes and maintained in the dark at 25 or 37°C

in a stationary incubator. Mortality was monitored twice daily. Larvae death was assessed by the lack of movement of larvae in response to stimulation together with discoloration of the cuticle. Different PBS and untreated controls were used for each experiment at each temperature. Killing curves were plotted and statistical analyses were performed using the Log-rank (Mantel-Cox) test survival Graph Pad Prism 5.

Assessment of melanization of *G. mellonella* after infection. After 6 h of the infection with different inocula of *P. lutzii* and *H. capsulatum* G184ARAR, pictures were taken with Olympus camera X-845, to show the darker areas as a result of the melanization process.

Histopathology. *P. lutzii* infected and uninfected larvae (three per group) were fixed by immersion in phosphate buffered 4% formalin after 3 d of infection. The larvae were cut into two symmetric pieces, and immersed in 70% ethanol. Sections were then embedded in paraffin wax, sectioned and stained with Periodic acid-Schiff (PAS) for microscopic examination at 10 \times magnification. The granuloma-like structures containing yeast were counted using Image Pro Plus 4.0 (1.45 Wayne Rasband NIH).

Determination of fungal burden in *G. mellonella*. Five days after the infection, four inoculated larvae were homogenized in 4 ml of PBS and 100 μ l aliquots of this solution were plated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (BD Difco Bacto) containing 0.1% and 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL/Life Technologies) to prevent bacterial growth. This experiment was performed using different inocula of *P. lutzii* and *H. capsulatum*. The plates were incubated at 37°C.

Statistical analysis. The data using *P. lutzii* were generated from two independent experiments, whereas the experiments with *H. capsulatum* G184AR (ATCC 26027) and G217B (ATCC 26032) were performed three and two times, respectively. Statistical analyses utilized Kaplan-Meier curves, Log-rank (Mantel-Cox) test survival, Gehan-Breslow-Wilcoxon and one way ANOVA, depending on the data using Graph Pad Prism 5 and Microsoft Excel. Statistical comparisons were made between treatments performed in parallel on the same day.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

L.T. was supported by a grant from FAPESP No. 2007/53175-1, Brazil. The work was supported in part by an Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases, Fogarty International Center (NIH D43-TW007129) J.D.N. is supported in part by NIH AI52733. Arturo Casadevall and Monica Garcia provided the larvae.

References

- Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:101-12; PMID:14975532; <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>.
- Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun* 2005; 73:4161-70; PMID:15972506; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005>.
- Brennan CA, Anderson KV. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:457-83; PMID:15032585; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.0127.03.104626>.
- Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a faithful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:567-613; PMID:11018138; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.567>.
- Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:332-7; PMID:12941400; [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00082-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00082-1).
- Casadevall A. Host as the variable: model hosts approach the immunological asymptote. *Infect Immun* 2005; 73:3829-32; PMID:15972467; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.7.3829-3832.2005>.
- Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 2003; 5:667-75; PMID:12787743; [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00092-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00092-3).
- Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Candida albicans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15675-80; PMID:12438649; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.232568599>.
- Mylonakis E, Ausubel FM, Tang RJ, Calderwood SB. The art of serendipity: killing of *Candida albicans* by human pathogens as a model of bacterial and fungal pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003; 1:167-73; PMID:15482109; <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.1.1.167>.
- London RJ, Oronco BS, Mylonakis E. The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res* 2006; 6:567-73; PMID:16696652; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00056.x>.
- Tang RJ, Bregler J, Idnurm A, Gerik KJ, Lodge JK, Heitman J, et al. *Cryptococcus neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Candida albicans* progeny-based approach. *Infect Immun* 2005; 73:8219-25; PMID:16299318; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.12.8219-8225.2005>.
- Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:346-51; PMID:16814595; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.004>.
- Tournu H, Smeets J, Van Dijk P. Fungal pathogens research: novel and improved molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets. *Curr Drug Targets* 2005; 6:909-22; PMID:16375674; <http://dx.doi.org/10.2174/138945005774912690>.
- Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 1):S111-4; PMID:16110801; <http://dx.doi.org/10.1080/13693780400020030>.
- Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 2004; 158:73-9; PMID:15487324; <http://dx.doi.org/10.1023/B:MYCO.0000038434.55764.16>.
- Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 2005; 73:3842-50; PMID:15972469; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005>.
- Dunphy GB, Oberholzer U, Whiteway M, Zakarian RJ, Boomer I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). *Can J Microbiol* 2003; 49:514-24; PMID:14608387; <http://dx.doi.org/10.1139/w03-064>.
- Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34:153-7; PMID:12381467; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00617.x>.
- Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia* 2006; 161:377-84; PMID:16761185; <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-006-0021-1>.
- Cyrynska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 2007; 28:533-46; PMID:17194500; <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.010>.
- Jarell KE, Kropinski AM. The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 1982; 39:395-400; PMID:6123536; [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90065-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(82)90065-9).
- Lemaire B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83; PMID:8808632; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5).
- Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, Mylonakis E. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell* 2004; 3:413-9; PMID:15075271; <http://dx.doi.org/10.1128/EC.3.2.413-419.2004>.
- Fuchs BB, Eby J, Noble CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 2010; 12:488-96; PMID:20223293; <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.001>.
- Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect* 2010; 12:146-53; PMID:19925881; <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.11.004>.
- Achterman RR, Smith AR, Oliver BG, White TC. Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Genet Biol* 2011; 48:335-41; PMID:21145410; <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.010>.
- St Leger RJ, Screen SE, Shams-Piradeh B. Lack of host specialization in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:320-4; PMID:10618242; <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.1.320-324.2000>.
- García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* 2011; 6:e24485; PMID:21915338; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024485>.
- Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes I, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 52:273-83; PMID:19376249; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.005>.
- Coutinho ZE, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 2002; 18:1441-54; PMID:12244377; <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000500037>.
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:513-21; PMID:19547881; <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000300019>.
- Chu JH, Feudtner C, Heydon K, Walsh TJ, Zaoutis TE. Hospitalizations for endemic mycoses: a population-based national study. *Clin Infect Dis* 2006; 42:822-5; PMID:16477560; <http://dx.doi.org/10.1086/500405>.
- Ratcliffe NA. Invertebrate immunity—a primer for the non-specialist. *Immunol Lett* 1985; 10:253-70; PMID:3950392; [http://dx.doi.org/10.1016/0165-2478\(85\)90100-2](http://dx.doi.org/10.1016/0165-2478(85)90100-2).
- Jackson JC, Higgins LA, Lin X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* 2009; 4:e4224; PMID:19156203; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004224>.
- Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27:163-9; PMID:10640612; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01427.x>.
- Bida G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun* 2009; 1:301-8; PMID:20375588; <http://dx.doi.org/10.1159/000168009>.
- Thomaz L, Apitz-Castro R, Marques AF, Travassos LR, Taborda CP. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Med Mycol* 2008; 46:113-8; PMID:18324489; <http://dx.doi.org/10.1080/13693780701651681>.
- Buiza-Filho R, Paccia R, Marques AF, Pinto FA, Munoz JE, Nosanchuk JD, et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. *Infect Immun* 2008; 76:3321-8; PMID:18458072; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00349-08>.
- Spitzer ED, Laaker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Hansenula capsulata*. *Infect Immun* 1989; 57:1409-12; PMID:2565290.
- Kim CH, Shin YH, Noh MY, Jo YH, Han YS, Seong YS, et al. An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *J Biol Chem* 2010; 285:25243-50; PMID:20519517; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.134940>.
- Castaneda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen JC, Stevens DA. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J Med Vet Mycol* 1988; 26:351-8; PMID:2977619; <http://dx.doi.org/10.1080/02681218880000501>.
- Jarosz J. Gut flora of *Galleria mellonella* suppressing ingested bacteria. *J Invertebr Pathol* 1979; 34:192-8; PMID:119813; [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(79\)90101-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(79)90101-0).

-
43. Bucher GE, Williams R. The microbial flora of laboratory cultures of the greater wax moth and its effect rearing parasites. *J Invertebr Pathol* 1967; 9:467-73; [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(67\)90125-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(67)90125-5).
44. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 2010; 1:475-82; PMID:21178491; <http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.6.12985>.

Bibliografía

- Almeida, G. M., Andrade, R. M. y Bento, C. A. (2001). The capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* activate normal CD4(+) T cells in a dominant Th2 pattern. *J Immunol* 167, 5845-5851.
- Alspaugh, J. A., Cavallo, L. M., Perfect, J. R. y Heitman, J. (2000). RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 36, 352-365.
- Alspaugh, J. A., Perfect, J. R. y Heitman, J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* 11, 3206-3217.
- Alspaugh, J. A., Pukkila-Worley, R., Harashima, T., Cavallo, L. M., Funnell, D., Cox, G. M., Perfect, J. R., Kronstad, J. W. y Heitman, J. (2002). Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 1, 75-84.
- Alvarado-Ramirez, E., Torres-Rodriguez, J. M., Sellart, M. y Vidotto, V. (2008). Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolated from goats. *Rev Iberoam Micol* 25, 150-153.
- Alvarez, M., Burn, T., Luo, Y., Pirofski, L. A. y Casadevall, A. (2009). The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. *BMC Microbiol* 9, 51.
- Alvarez, M. y Casadevall, A. (2006). Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16, 2161-2165.
- Alvarez, M. y Casadevall, A. (2007). Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol* 8, 16.
- Aminnejad, M., Diaz, M., Arabatzis, M., Castaneda, E., Lazera, M., Velegraki, A., Marriott, D., Sorrell, T. C. y Meyer, W. (2012). Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. grubii VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia* 173, 337-346.
- Apidianakis, Y., Rahme, L. G., Heitman, J., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B. y Mylonakis, E. (2004). Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell* 3, 413-419.
- Azie, N., Neofytos, D., Pfaller, M., Meier-Kriesche, H. U., Quan, S. P. y Horn, D. (2012). The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance(R) registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73, 293-300.
- Bar-Peled, M., Griffith, C. L. y Doering, T. L. (2001). Functional cloning and characterization of a UDP- glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12003-12008.
- Barreto de Oliveira, M. T., Boekhout, T., Theelen, B., Hagen, F., Baroni, F. A., Lazera, M. S., Lengeler, K. B., Heitman, J., Rivera, I. N. y Paula, C. R. (2004). *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J Clin Microbiol* 42, 1356-1359.
- Bedford, M. T. y Leder, P. (1999). The FF domain: a novel motif that often accompanies WW domains. *Trends Biochem Sci* 24, 264-265.

Benham, R. W. (1935). Cryptococci: their identification by morphology and by serology. *J Infect Dis* 57, 255-274.

Bergin, D., Brennan, M. y Kavanagh, K. (2003). Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 5, 1389-1395.

Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J. W., Hop, W. C., Abeln, E. C., Dromer, F. y Meyer, W. (2001). Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147, 891-907.

Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E. E., Diaz, M. R., Spanjaard, L., Dromer, F., Hoogveld, H. L. y Boekhout, T. (2006). Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res* 6, 599-607.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P. y Herndon, D. N. (2009). Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10, 389-397.

Brennan, M., Thomas, D. Y., Whiteway, M. y Kavanagh, K. (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 153-157.

Brivio, M. F., Mastore, M. y Nappi, A. J. (2010). A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Dev Comp Immunol* 34, 991-998.

Brummer, E. (1998). Human defenses against *Cryptococcus neoformans*: an update. *Mycopathologia* 143, 121-125.

Burnie, J. P., Carter, T. L., Hodgetts, S. J. y Matthews, R. C. (2006). Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev* 30, 53-88.

Byrnes, E. J., 3rd, Bildfell, R. J., Frank, S. A., Mitchell, T. G., Marr, K. A. y Heitman, J. (2009). Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J Infect Dis* 199, 1081-1086.

Byrnes, E. J., 3rd, Li, W., Lewit, Y., Ma, H., Voelz, K., Ren, P., Carter, D. A., Chaturvedi, V., Bildfell, R. J., May, R. C. y Heitman, J. (2010). Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog* 6, e1000850.

Byrnes, E. J., 3rd y Marr, K. A. (2011). The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues. *Curr Infect Dis Rep* 13, 256-261.

Byrnes, E. J. y Heitman, J. (2009). *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol Rep* 1.

Campbell, L. T., Fraser, J. A., Nichols, C. B., Dietrich, F. S., Carter, D. y Heitman, J. (2005). Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Australia that retain sexual fecundity. *Eukaryot Cell* 4, 1410-1419.

Carreira, A., Ferreira, L. M. y Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl Environ Microbiol* 67, 3463-3468.

Carty, S. M., Goldstrohm, A. C., Sune, C., Garcia-Blanco, M. A. y Greenleaf, A. L. (2000). Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9015-9020.

Casadevall, A. (2010). Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? *J Clin Invest* 120, 1389-1392.

Casadevall, A., Mukherjee, J., Devi, S. J., Schneerson, R., Robbins, J. B. y Scharff, M. D. (1992a). Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. *J Infect Dis* 165, 1086-1093.

Casadevall, A., Mukherjee, J. y Scharff, M. D. (1992b). Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods* 154, 27-35.

Casadevall, A., Nosanchuk, J. D., Williamson, P. y Rodrigues, M. L. (2009). Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol* 17, 158-162.

Casadevall, A. y Perfect, J. (1998). *Cryptococcus neoformans* (Washington DC: ASM).

Casadevall, A., Rosas, A. L. y Nosanchuk, J. D. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* 3, 354-358.

Casadevall, A., Steenbergen, J. N. y Nosanchuk, J. D. (2003). 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 6, 332-337.

Castillo-Lluva, S. y Perez-Martin, J. (2005). The induction of the mating program in the phytopathogen *Ustilago maydis* is controlled by a G1 cyclin. *Plant Cell* 17, 3544-3560.

Cleare, W. y Casadevall, A. (1998). The different binding patterns of two immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* serotype A and D strains correlate with serotype classification and differences in functional assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 125-129.

Coenjaerts, F. E., Hoepelman, A. I., Scharringa, J., Aarts, M., Ellerbroek, P. M., Bevaart, L., Van Strijp, J. A. y Janbon, G. (2006). The Skn7 response regulator of *Cryptococcus neoformans* is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. *FEMS Yeast Res* 6, 652-661.

Cogliati, M., Esposto, M. C., Clarke, D. L., Wickes, B. L. y Viviani, M. A. (2001). Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains. *J Clin Microbiol* 39, 3889-3894.

Cordero, R. J., Frases, S., Guimaraes, A. J., Rivera, J. y Casadevall, A. (2011a). Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity. *Mol Microbiol* 79, 1101-1117.

Cordero, R. J., Pontes, B., Frases, S., Nakouzi, A. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Viana, N. B. y Casadevall, A. (2013). Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. *J Immunol* 190, 317-323.

Cordero, R. J., Pontes, B., Guimaraes, A. J., Martinez, L. R., Rivera, J., Fries, B. C., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Viana, N. B. y Casadevall, A. (2011b). Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 79, 4990-5000.

Crabtree, J. N., Okagaki, L. H., Wiesner, D. L., Strain, A. K., Nielsen, J. N. y Nielsen, K. (2012). Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 80, 3776-3785.

Crowe, S. M., Carlin, J. B., Stewart, K. I., Lucas, C. R. y Hoy, J. F. (1991). Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4, 770-776.

Cruickshank, J. G., Cavill, R. y Jelbert, M. (1973). *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. *Appl Microbiol* 25, 309-312.

Currie, B. P. y Casadevall, A. (1994). Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. *Clin Infect Dis* 19, 1029-1033.

Cytrynska, M., Zdybicka-Barabas, A. y Jakubowicz, T. (2007). The involvement of protein kinase A in the immune response of *Galleria mellonella* larvae to bacteria. *Acta Biochim Pol* 54, 167-174.

Chang, Y. C. y Kwon-Chung, K. J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* 14, 4912-4919.

Chang, Y. C. y Kwon-Chung, K. J. (1998). Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 66, 2230-2236.

Chang, Y. C. y Kwon-Chung, K. J. (1999). Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 181, 5636-5643.

Chang, Y. C., Penoyer, L. A. y Kwon-Chung, K. J. (1996). The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun* 64, 1977-1983.

Chang, Y. C., Stins, M. F., McCaffery, M. J., Miller, G. F., Pare, D. R., Dam, T., Paul-Satyaseela, M., Kim, K. S. y Kwon-Chung, K. J. (2004). Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun* 72, 4985-4995.

Chang, Y. C., Wickes, B. L. y Kwon-Chung, K. J. (1995). Further analysis of the CAP59 locus of *Cryptococcus neoformans*: structure defined by forced expression and description of a new ribosomal protein-encoding gene. *Gene* 167, 179-183.

Chapa y Lazo, B., Bates, S. y Sudbery, P. (2005). The G1 cyclin Cln3 regulates morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4, 90-94.

Charlier, C., Chretien, F., Baudrimont, M., Mordelet, E., Lortholary, O. y Dromer, F. (2005). Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 166, 421-432.

- Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F. y Dromer, F. (2009). Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77, 120-127.
- Chen, J., Varma, A., Diaz, M. R., Litvintseva, A. P., Wollenberg, K. K. y Kwon-Chung, K. J. (2008). *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg Infect Dis* 14, 755-762.
- Chen, R. y Jeong, S. S. (2000). Functional prediction: identification of protein orthologs and paralogs. *Protein Sci* 9, 2344-2353.
- Chen, S. C., Wright, L. C., Golding, J. C. y Sorrell, T. C. (2000). Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochem J* 347, 431-439.
- Chen, S. C., Wright, L. C., Santangelo, R. T., Muller, M., Moran, V. R., Kuchel, P. W. y Sorrell, T. C. (1997). Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 65, 405-411.
- Chen, S. H., Stins, M. F., Huang, S. H., Chen, Y. H., Kwon-Chung, K. J., Chang, Y., Kim, K. S., Suzuki, K. y Jong, A. Y. (2003). *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* 52, 961-970.
- Cheng, P. Y., Sham, A. y Kronstad, J. W. (2009). *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77, 4284-4294.
- Cherniak, R. y Sundstrom, J. B. (1994). Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 62, 1507-1512.
- Choi, J., Vogl, A. W. y Kronstad, J. W. (2012). Regulated expression of cyclic AMP-dependent protein kinase A reveals an influence on cell size and the secretion of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 85, 700-715.
- Choi, Y. E. y Goodwin, S. B. (2011). Gene encoding a c-type cyclin in *Mycosphaerella graminicola* is involved in aerial mycelium formation, filamentous growth, hyphal swelling, melanin biosynthesis, stress response, and pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 469-477.
- Chottanapund, S., Singhasivanon, P., Kaewkungwal, J., Chamroonswasdi, K. y Manosuthi, W. (2007). Survival time of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis. *J Med Assoc Thai* 90, 2104-2111.
- Chrisman, C. J., Albuquerque, P., Guimaraes, A. J., Nieves, E. y Casadevall, A. (2011). Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog* 7, e1002047.
- Chun, C. D., Brown, J. C. y Madhani, H. D. (2011). A major role for capsule-independent phagocytosis-inhibitory mechanisms in mammalian infection by *Cryptococcus neoformans*. *Cell Host Microbe* 9, 243-251.

- D'Souza, C. A., Alspaugh, J. A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G. M., Perfect, J. R. y Heitman, J. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 21, 3179-3191.
- Dadachova, E., Bryan, R. A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Nosanchuk, J. D. y Casadevall, A. (2007). Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One* 2, e457.
- Davis, J., Zheng, W. Y., Glatman-Freedman, A., Ng, J. A., Pagcatipunan, M. R., Lessin, H., Casadevall, A. y Goldman, D. L. (2007). Serologic evidence for regional differences in pediatric cryptococcal infection. *Pediatr Infect Dis J* 26, 549-551.
- De Jesus, M., Nicola, A. M., Rodrigues, M. L., Janbon, G. y Casadevall, A. (2009). Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryot Cell* 8, 96-103.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. y de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., Roncarolo, M. G., Spits, H. y de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4, 314-320.
- Del Poeta, M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3, 1067-1075.
- Diamond, R. D. y Bennett, J. E. (1973). Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages in vitro. *Infect Immun* 7, 231-236.
- Diamond, R. D., May, J. E., Kane, M., Frank, M. M. y Bennett, J. E. (1973). The role of late complement components and the alternate complement pathway in experimental cryptococcosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 144, 312-315.
- Diamond, R. D., May, J. E., Kane, M. A., Frank, M. M. y Bennett, J. E. (1974). The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 112, 2260-2270.
- Doering, T. L. (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63, 223-247.
- Dong, Z. M. y Murphy, J. W. (1995). Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect Immun* 63, 2632-2644.
- Dong, Z. M. y Murphy, J. W. (1997). Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. *Infect Immun* 65, 557-563.
- Dromer, F., Casadevall, A., Perfect, J. y Sorrell, T. (2011). *Cryptococcus neoformans*: Latency and Disease, In *Cryptococcus*. From human pathogen to model yeast, T. R. K. Joseph Heitman, Kyung J Kwon-Chung, John R Perfect, and Arturo Casadevall, ed. (Washington: ASM), pp. 431-441.

- Dromer, F. y Levitz, S. M. (2011). Invasion of *Cryptococcus* into the central nervous system, In *Cryptococcus. From human to model yeast*, T. R. K. Joseph Heitman, Kyung J Kwon-Chung, John R Perferct, and Arturo Casadevall, ed. (Washington: ASM), pp. 464-471.
- Dromer, F., Mathoulin-Pelissier, S., Launay, O. y Lortholary, O. (2007). Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med* 4, e21.
- Dromer, F., Perronne, C., Barge, J., Vilde, J. L. y Yeni, P. (1989). Role of IgG and complement component C5 in the initial course of experimental cryptococcosis. *Clin Exp Immunol* 78, 412-417.
- Dubovskiy, I. M., Krukova, N. A. y Glupov, V. V. (2008). Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 98, 360-362.
- Eisenman, H. C., Chow, S. K., Tse, K. K., McClelland, E. E. y Casadevall, A. (2011). The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence* 2, 329-336.
- Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G. y Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology* 153, 3954-3962.
- Ellerbroek, P. M., Lefeber, D. J., van Veghel, R., Scharringa, J., Brouwer, E., Gerwig, G. J., Janbon, G., Hoepelman, A. I. y Coenjaerts, F. E. (2004). O-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration. *J Immunol* 173, 7513-7520.
- Ellis, D. y Pfeiffer, T. (1992). The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol* 8, 321-325.
- Erjavec, Z., Kluin-Nelemans, H. y Verweij, P. E. (2009). Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 15, 625-633.
- Evans, E. E., Garcia, C., Kornfeld, L. y Seeliger, H. P. (1956). Failure to demonstrate capsular swelling in *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med* 93, 257-260.
- Feldmesser, M., Kress, Y. y Casadevall, A. (2001a). Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147, 2355-2365.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P. y Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68, 4225-4237.
- Feldmesser, M., Tucker, S. y Casadevall, A. (2001b). Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 9, 273-278.
- Fortes, S. T., Lazera, M. S., Nishikawa, M. M., Macedo, R. C. y Wanke, B. (2001). First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44, 137-140.
- Franzot, S. P., Salkin, I. F. y Casadevall, A. (1999). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 37, 838-840.
- Friedman, G. D., Jeffrey Fessel, W., Udaltsova, N. V. y Hurley, L. B. (2005). Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses* 48, 122-125.

- Fuchs, B. B., O'Brien, E., Khoury, J. B. y Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1, 475-482.
- Gabaldon, T. (2008). Large-scale assignment of orthology: back to phylogenetics? *Genome Biol* 9, 235.
- Galanis, E. y Macdougall, L. (2010). Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis* 16, 251-257.
- Garcia-Hermoso, D., Dromer, F. y Janbon, G. (2004). *Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution in vitro and during murine infection. *Infect Immun* 72, 3359-3365.
- Garcia-Hermoso, D., Janbon, G. y Dromer, F. (1999). Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol* 37, 3204-3209.
- Garcia-Rivera, J., Eisenman, H. C., Nosanchuk, J. D., Aisen, P., Zaragoza, O., Moadel, T., Dadachova, E. y Casadevall, A. (2005). Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. *Fungal Genet Biol* 42, 989-998.
- Garcia-Rodas, R., Gonzalez-Camacho, F., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. y Zaragoza, O. (2011). The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. *Infect Immun* 79, 2136-2144.
- Garcia-Rodas, R. y Zaragoza, O. (2012). Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64, 147-161.
- Gates, M. A., Thorkildson, P. y Kozel, T. R. (2004). Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* 52, 13-24.
- Gazzoni, A. F., Oliveira Fde, M., Salles, E. F., Mayayo, E., Guarro, J., Capilla, J. y Severo, L. C. (2010). Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52, 145-149.
- Gibson, T. J., Thompson, J. D., Blocker, A. y Kouzarides, T. (1994). Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107. *Nucleic Acids Res* 22, 946-952.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. y Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077-1090.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. y Kronstad, J. (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* 8, 2805-2816.
- Goldman, D., Lee, S. C. y Casadevall, A. (1994). Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. *Infect Immun* 62, 4755-4761.
- Goldman, D. L., Lee, S. C., Mednick, A. J., Montella, L. y Casadevall, A. (2000). Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism,

decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* 68, 832-838.

Granger, D. L., Perfect, J. R. y Durack, D. T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* 76, 508-516.

Grechi, J., Marinho-Carvalho, M., Zancan, P., Cinelli, L. P., Gomes, A. M., Rodrigues, M. L., Nimrichter, L. y Sola-Penna, M. (2011). Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. *J Biol Chem* 286, 14820-14829.

Guimaraes, A. J., Frases, S., Cordero, R. J., Nimrichter, L., Casadevall, A. y Nosanchuk, J. D. (2010). *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. *Cell Microbiol* 12, 740-753.

Harris, J. R., Lockhart, S. R., Debess, E., Marsden-Haug, N., Goldoft, M., Wohrle, R., Lee, S., Smelser, C., Park, B. y Chiller, T. (2011). *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin Infect Dis* 53, 1188-1195.

Hartwell, L. H. y Unger, M. W. (1977). Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J Cell Biol* 75, 422-435.

Haynes, B. C., Skowrya, M. L., Spencer, S. J., Gish, S. R., Williams, M., Held, E. P., Brent, M. R. y Doering, T. L. (2011). Toward an integrated model of capsule regulation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 7, e1002411.

Hazen, K. C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8, 462-478.

Heitman, J., Kozel, T., Kwon-Chung, K., Perfect, J. y Casadevall, A. (2011). *Cryptococcus*. From Human pathogen to model yeast (Washington DC: ASM Press).

Hoang, L. M., Maguire, J. A., Doyle, P., Fyfe, M. y Roscoe, D. L. (2004). *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J Med Microbiol* 53, 935-940.

Hoyt, M. A., Totis, L. y Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.

Hsieh, E., Smith, P. B., Jacqz-Aigrain, E., Kaguelidou, F., Cohen-Wolkowicz, M., Manzoni, P. y Benjamin, D. K., Jr. (2012). Neonatal fungal infections: when to treat? *Early Hum Dev* 88 Suppl 2, S6-S10.

Hu, K., Li, J., Li, B., Webster, J. M. y Chen, G. (2006). A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). *Bioorg Med Chem* 14, 4677-4681.

Huffnagle, G. B. (1996). Role of cytokines in T cell immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Biol Signals* 5, 215-222.

Idnurm, A., Bahn, Y. S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J. A. y Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 3, 753-764.

Igual, J. C., Johnson, A. L. y Johnston, L. H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *Embo J* 15, 5001-5013.

Irniger, S. y Nasmyth, K. (1997). The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *J Cell Sci* 110 (Pt 13), 1523-1531.

Jain, A. V., Zhang, Y., Fields, W. B., McNamara, D. A., Choe, M. Y., Chen, G. H., Erb-Downward, J., Osterholzer, J. J., Toews, G. B., Huffnagle, G. B. y Olszewski, M. A. (2009). Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* 77, 5389-5399.

Janbon, G., Himmelreich, U., Moyrand, F., Improvisi, L. y Dromer, F. (2001). Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* 42, 453-467.

Jander, G., Rahme, L. G. y Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 182, 3843-3845.

Jiang, N., Sun, N., Xiao, D., Pan, J., Wang, Y. y Zhu, X. (2009). A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett* 296, 84-90.

Johnston, G. C., Pringle, J. R. y Hartwell, L. H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* 105, 79-98.

Jongwutiwes, U., Kiertiburanakul, S. y Sungkanuparph, S. (2007). Impact of antiretroviral therapy on the relapse of cryptococcosis and survival of HIV-infected patients with cryptococcal infection. *Curr HIV Res* 5, 355-360.

Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breitskreutz, B. J. y Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400.

Kidd, S. E., Bach, P. J., Hingston, A. O., Mak, S., Chow, Y., MacDougall, L., Kronstad, J. W. y Bartlett, K. H. (2007). *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis* 13, 51-57.

Kidd, S. E., Hagen, F., Tschärke, R. L., Huynh, M., Bartlett, K. H., Fyfe, M., Macdougall, L., Boekhout, T., Kwon-Chung, K. J. y Meyer, W. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17258-17263.

Kim, C. H., Shin, Y. P., Noh, M. Y., Jo, Y. H., Han, Y. S., Seong, Y. S. y Lee, I. H. (2010). An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *J Biol Chem* 285, 25243-25250.

Kim, K. S. (2008). Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* 6, 625-634.

- Koguchi, Y. y Kawakami, K. (2002). Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int Rev Immunol* 21, 423-438.
- Kozel, T. R. y Gotschlich, E. C. (1982). The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol* 129, 1675-1680.
- Kozel, T. R., Highison, B. y Stratton, C. J. (1984). Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 43, 574-579.
- Kozel, T. R., Levitz, S. M., Dromer, F., Gates, M. A., Thorkildson, P. y Janbon, G. (2003). Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O acetylation or xylosyl side chains. *Infect Immun* 71, 2868-2875.
- Kozel, T. R., Pfrommer, G. S., Guerlain, A. S., Highison, B. A. y Highison, G. J. (1988). Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2, S436-439.
- Kozel, T. R., Wilson, M. A., Pfrommer, G. S. y Schlageter, A. M. (1989). Activation and binding of opsonic fragments of C3 on encapsulated *Cryptococcus neoformans* by using an alternative complement pathway reconstituted from six isolated proteins. *Infect Immun* 57, 1922-1927.
- Kozubowski, L. y Heitman, J. (2012). Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev* 36, 78-94.
- Kraus, P. R., Boily, M. J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., Dietrich, F. S., Perfect, J. R. y Heitman, J. (2004). Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryot Cell* 3, 1249-1260.
- Kwon-Chung, K. J. (1976). Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 68, 821-833.
- Kwon-Chung, K. J. y Bennett, J. E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 120, 123-130.
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I. y Popkin, T. J. (1982). Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J Bacteriol* 150, 1414-1421.
- Kwon-Chung, K. J., Tom, W. K. y Costa, J. L. (1983). Utilization of indole compounds by *Cryptococcus neoformans* to produce a melanin-like pigment. *J Clin Microbiol* 18, 1419-1421.
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M. y Hoffmann, J. A. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11427-11432.
- Larsen, R. A., Bozzette, S., McCutchan, J. A., Chiu, J., Leal, M. A. y Richman, D. D. (1989). Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med* 111, 125-128.
- Lazera, M. S., Salmito Cavalcanti, M. A., Londero, A. T., Trilles, L., Nishikawa, M. M. y Wanke, B. (2000). Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 38, 379-383.

- Lee, S. C., Kress, Y., Zhao, M. L., Dickson, D. W. y Casadevall, A. (1995). *Cryptococcus neoformans* survive and replicate in human microglia. *Lab Invest* 73, 871-879.
- Lengeler, K. B., Cox, G. M. y Heitman, J. (2001). Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun* 69, 115-122.
- Levitz, S. M. (1994). Macrophage-*Cryptococcus* interactions. *Immunol Ser* 60, 533-543.
- Levitz, S. M., Nong, S. H., Seetoo, K. F., Harrison, T. S., Speizer, R. A. y Simons, E. R. (1999). *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* 67, 885-890.
- Lew, D. J. y Reed, S. I. (1995). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* 5, 17-23.
- Lew DJ, W. T., Pringle JR. (1997). Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*., In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. III, P. J. Jones EW, Broach JR, ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 607-695.
- Li, R. K. y Mitchell, T. G. (1997). Induction of interleukin-6 mRNA in rat alveolar macrophages by in vitro exposure to both *Cryptococcus neoformans* and anti-*C. neoformans* antiserum. *J Med Vet Mycol* 35, 327-334.
- Liao, C. H., Chi, C. Y., Wang, Y. J., Tseng, S. W., Chou, C. H., Ho, C. M., Lin, P. C., Ho, M. W. y Wang, J. H. (2012). Different presentations and outcomes between HIV-infected and HIV-uninfected patients with Cryptococcal meningitis. *J Microbiol Immunol Infect* 45, 296-304.
- Liu, L., Tewari, R. P. y Williamson, P. R. (1999). Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* 67, 6034-6039.
- Liu, O. W., Chun, C. D., Chow, E. D., Chen, C., Madhani, H. D. y Noble, S. M. (2008). Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* 135, 174-188.
- Loeb, J. D., Kerentseva, T. A., Pan, T., Sepulveda-Becerra, M. y Liu, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins are differentially involved in invasive and pseudohyphal growth independent of the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway. *Genetics* 153, 1535-1546.
- Loftus, B. J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I. J., Fraser, J. A. *et al.* (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307, 1321-1324.
- Lortholary, O., Improvisi, L., Rayhane, N., Gray, F., Fitting, C., Cavaillon, J. M. y Dromer, F. (1999). Cytokine profiles of AIDS patients are similar to those of mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* 67, 6314-6320.
- Lortholary, O., Poizat, G., Zeller, V., Neuville, S., Boibieux, A., Alvarez, M., Dellamonica, P., Botterel, F., Dromer, F. y Chene, G. (2006). Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids* 20, 2183-2191.

- Love, G. L., Boyd, G. D. y Greer, D. L. (1985). Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol* 22, 1068-1070.
- Luberto, C., Martinez-Marino, B., Taraskiewicz, D., Bolanos, B., Chitano, P., Toffaletti, D. L., Cox, G. M., Perfect, J. R., Hannun, Y. A., Balish, E. y Del Poeta, M. (2003). Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 112, 1080-1094.
- Lupo, P., Chang, Y. C., Kelsall, B. L., Farber, J. M., Pietrella, D., Vecchiarelli, A., Leon, F. y Kwon-Chung, K. J. (2008). The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infect Immun* 76, 1581-1589.
- Ma, H., Croudace, J. E., Lammas, D. A. y May, R. C. (2006). Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 16, 2156-2160.
- Ma, H., Croudace, J. E., Lammas, D. A. y May, R. C. (2007). Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunol* 8, 15.
- MacDougall, L., Kidd, S. E., Galanis, E., Mak, S., Leslie, M. J., Cieslak, P. R., Kronstad, J. W., Morshed, M. G. y Bartlett, K. H. (2007). Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis* 13, 42-50.
- MacGill, T. C., MacGill, R. S., Casadevall, A. y Kozel, T. R. (2000). Biological correlates of capsular (quellung) reactions of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 164, 4835-4842.
- Malliaris, S. D., Steenbergen, J. N. y Casadevall, A. (2004). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med Mycol* 42, 149-158.
- Mansour, M. K., Latz, E. y Levitz, S. M. (2006). *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. *J Immunol* 176, 3053-3061.
- Mansour, M. K. y Levitz, S. M. (2002). Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5, 359-365.
- Mansour, M. K., Yauch, L. E., Rottman, J. B. y Levitz, S. M. (2004). Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. *Infect Immun* 72, 1746-1754.
- Maxson, M. E., Cook, E., Casadevall, A. y Zaragoza, O. (2007a). The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol* 44, 180-186.
- Maxson, M. E., Dadachova, E., Casadevall, A. y Zaragoza, O. (2007b). Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot Cell* 6, 95-109.
- McFadden, D. C., Fries, B. C., Wang, F. y Casadevall, A. (2007). Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 6, 1464-1473.
- McNeil, M. M., Nash, S. L., Hajjeh, R. A., Phelan, M. A., Conn, L. A., Plikaytis, B. D. y Warnock, D. W. (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 33, 641-647.
- Mesa-Arango, A. C., Forastiero, A., Bernal-Martinez, L., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E. y Zaragoza, O. (2012). The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the

virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol*.

Meyer, W., Marszewska, K., Amirmostofian, M., Igreja, R. P., Hardtke, C., Methling, K., Viviani, M. A., Chindamporn, A., Sukroongreung, S., John, M. A. *et al.* (1999). Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20, 1790-1799.

Meyer, W. y Mitchell, T. G. (1995). Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 16, 1648-1656.

Miceli, M. H., Diaz, J. A. y Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11, 142-151.

Miceli, M. H. y Lee, S. A. (2008). Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. *Mycoses* 54, e666-678.

Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M. E., Gardner, T., Sattah, M., de Leon, G. P., Baughman, W. y Hajjeh, R. A. (2003). The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis* 36, 789-794.

Missall, T. A., Moran, J. M., Corbett, J. A. y Lodge, J. K. (2005). Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryot Cell* 4, 202-208.

Mitchell, T. G. y Friedman, L. (1972). In vitro phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 5, 491-498.

Mitchell, T. G. a. P., J. R. (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8, 515-548.

Mitsuzawa, H. (1994). Increases in cell size at START caused by hyperactivation of the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 243, 158-165.

Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. y Drenkard, E. (2003). Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 71, 2404-2413.

Moita, L. F., Wang-Sattler, R., Michel, K., Zimmermann, T., Blandin, S., Levashina, E. A. y Kafatos, F. C. (2005). In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity* 23, 65-73.

Monari, C., Bistoni, F. y Vecchiarelli, A. (2006). Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res* 6, 537-542.

- Monari, C., Pericolini, E., Bistoni, G., Casadevall, A., Kozel, T. R. y Vecchiarelli, A. (2005). *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *J Immunol* 174, 3461-3468.
- Moore, S. A. (1984). Synchronous cell growth occurs upon synchronizing the two regulatory steps of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Exp Cell Res* 151, 542-556.
- Morton, D. B., Barnett, R. I. y Chadwick, J. S. (1984). Structural alterations to *Proteus mirabilis* as a result of exposure to haemolymph from the larvae of *Galleria mellonella*. *Microbios* 39, 177-185.
- Moyrand, F., Chang, Y. C., Himmelreich, U., Kwon-Chung, K. J. y Janbon, G. (2004). Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot Cell* 3, 1513-1524.
- Moyrand, F., Fontaine, T. y Janbon, G. (2007). Systematic capsule gene disruption reveals the central role of galactose metabolism on *Cryptococcus neoformans* virulence. *Mol Microbiol* 64, 771-781.
- Mukherjee, J., Cleare, W. y Casadevall, A. (1995). Monoclonal antibody mediated capsular reactions (Quellung) in *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol Methods* 184, 139-143.
- Mukherjee, J., Kozel, T. R. y Casadevall, A. (1998). Monoclonal antibodies reveal additional epitopes of serotype D *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan that elicit protective antibodies. *J Immunol* 161, 3557-3568.
- Muller, U., Stenzel, W., Kohler, G., Werner, C., Polte, T., Hansen, G., Schutze, N., Straubinger, R. K., Blessing, M., McKenzie, A. N. et al. (2007). IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 179, 5367-5377.
- Muñoz, M. J., Bejarano, E. R., Daga, R. R. y Jimenez, J. (1999). The identification of Wos2, a p23 homologue that interacts with Wee1 and Cdc2 in the mitotic control of fission yeasts. *Genetics* 153, 1561-1572.
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J. y Calderwood, S. B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15675-15680.
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S. B., Ausubel, F. M. y Diener, A. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 73, 3842-3850.
- Naslund, P. K., Miller, W. C. y Granger, D. L. (1995). *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infect Immun* 63, 1298-1304.
- Neilson, J. B., Fromtling, R. A. y Bulmer, G. S. (1981). Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: decreased survival in vivo. *Mycopathologia* 73, 57-59.
- Neilson, J. B., Ivey, M. H. y Bulmer, G. S. (1978). *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun* 20, 262-266.

Neill, J. M., Castillo, C. G. y et al. (1949). Capsular reactions and soluble antigens of *Torula histolytica* and of *Sporotrichum schenckii*. J Exp Med 89, 93-106.

Ngamskulrungrroj, P., Chang, Y., Sionov, E. y Kwon-Chung, K. J. (2012). The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. MBio 3.

Nicola, A. M., Robertson, E. J., Albuquerque, P., Derengowski Lda, S. y Casadevall, A. (2011). Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. MBio 2.

Nishikawa, M. M., Lazera, M. S., Barbosa, G. G., Trilles, L., Balassiano, B. R., Macedo, R. C., Bezerra, C. C., Perez, M. A., Cardarelli, P. y Wanke, B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microbiol 41, 73-77.

Noble, M. E., Endicott, J. A., Brown, N. R. y Johnson, L. N. (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. Trends Biochem Sci 22, 482-487.

Nosanchuk, J. D., Nimrichter, L., Casadevall, A. y Rodrigues, M. L. (2008). A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. Commun Integr Biol 1, 37-39.

Noverr, M. C., Williamson, P. R., Fajardo, R. S. y Huffnagle, G. B. (2004). CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. Infect Immun 72, 1693-1699.

Nurudeen, T. A. y Ahearn, D. G. (1979). Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 10, 724-729.

O'Meara, T. R. y Alspaugh, J. A. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. Clin Microbiol Rev 25, 387-408.

Okagaki, L. H. y Nielsen, K. (2012). Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. Eukaryot Cell 11, 820-826.

Okagaki, L. H., Strain, A. K., Nielsen, J. N., Charlier, C., Baltes, N. J., Chretien, F., Heitman, J., Dromer, F. y Nielsen, K. (2010). Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. PLoS Pathog 6, e1000953.

Okagaki, L. H., Wang, Y., Ballou, E. R., O'Meara, T. R., Bahn, Y. S., Alspaugh, J. A., Xue, C. y Nielsen, K. (2011). Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli. Eukaryot Cell 10, 1306-1316.

Oliveira, D. L., Freire-de-Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L. y Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. Infect Immun 78, 1601-1609.

Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Miranda, K., Frases, S., Faull, K. F., Casadevall, A. y Rodrigues, M. L. (2009). *Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan. Fungal Genet Biol 46, 956-963.

- Olszewski, M. A., Noverr, M. C., Chen, G. H., Toews, G. B., Cox, G. M., Perfect, J. R. y Huffnagle, G. B. (2004). Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* 164, 1761-1771.
- Osterholzer, J. J., Surana, R., Milam, J. E., Montano, G. T., Chen, G. H., Sonstein, J., Curtis, J. L., Huffnagle, G. B., Toews, G. B. y Olszewski, M. A. (2009). Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol* 174, 932-943.
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G. y Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids* 23, 525-530.
- Paterson, D. L., Singh, N., Gayowski, T. y Marino, I. R. (1998). Pulmonary nodules in liver transplant recipients. *Medicine (Baltimore)* 77, 50-58.
- Perfect, J. R. (2005). *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45, 395-404.
- Perfect, J. R., Lang, S. D. y Durack, D. T. (1980). Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol* 101, 177-194.
- Pettinato, G., Manivel, J. C., Petrella, G. y De Chiara, A. (1991). Primary multilobated T-cell lymphoma of the breast diagnosed by fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry. *Acta Cytol* 35, 294-299.
- Pfeiffer, T. J. y Ellis, D. H. (1992). Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 30, 407-408.
- Pierini, L. M. y Doering, T. L. (2001). Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 41, 105-115.
- Pietrella, D., Corbucci, C., Perito, S., Bistoni, G. y Vecchiarelli, A. (2005). Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun* 73, 820-827.
- Plonka, P. M. y Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol* 53, 429-443.
- Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q. D., Kraus, P. R., Boily, M. J., Davis, M. J., Giles, S. S., Cox, G. M., Heitman, J. y Alspaugh, J. A. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell* 4, 190-201.
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. y Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-267.
- Reeves, E. P., Messina, C. G., Doyle, S. y Kavanagh, K. (2004). Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158, 73-79.

- Retini, C., Vecchiarelli, A., Monari, C., Tascini, C., Bistoni, F. y Kozel, T. R. (1996). Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. *Infect Immun* 64, 2897-2903.
- Rhodes, J. C., Polacheck, I. y Kwon-Chung, K. J. (1982). Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 36, 1175-1184.
- Rodrigues, M. L., Alvarez, M., Fonseca, F. L. y Casadevall, A. (2008a). Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell* 7, 602-609.
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. y Casadevall, A. (2008b). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7, 58-67.
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M. y Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6, 48-59.
- Roeder, A., Kirschning, C. J., Rupec, R. A., Schaller, M. y Korting, H. C. (2004). Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol* 12, 44-49.
- Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegrielli Fungaro, M. H., Schrank, A. y Vainstein, M. H. (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol* 159, 221-229.
- Rosas, A. L. y Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* 153, 265-272.
- Rueping, M. J., Vehreschild, J. J. y Cornely, O. A. (2009). Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs* 18, 735-748.
- Saha, D. C., Goldman, D. L., Shao, X., Casadevall, A., Husain, S., Limaye, A. P., Lyon, M., Somani, J., Pursell, K., Pruett, T. L. y Singh, N. (2007). Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1550-1554.
- Santangelo, R., Zoellner, H., Sorrell, T., Wilson, C., Donald, C., Djordjevic, J., Shounan, Y. y Wright, L. (2004). Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect Immun* 72, 2229-2239.
- Saylor, C. A., Dadachova, E. y Casadevall, A. (2010). Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* through different receptors. *J Immunol* 184, 336-343.
- Scorzoni, L., de Lucas, M. P., Mesa-Arango, A. C., Fusco-Almeida, A. M., Lozano, E., Cuenca-Estrella, M., Mendes-Giannini, M. J. y Zaragoza, O. (2013). Antifungal efficacy during *Candida*

krusei infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. PLoS One 8, e60047.

Schoffelen, T., Illnait-Zaragozi, M. T., Joosten, L. A., Netea, M. G., Boekhout, T., Meis, J. F. y Sprong, T. (2013). *Cryptococcus gattii* induces a cytokine pattern that is distinct from other cryptococcal species. PLoS One 8, e55579.

Shim, W. B. y Woloshuk, C. P. (2001). Regulation of fumonisin B(1) biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. Appl Environ Microbiol 67, 1607-1612.

Simonsen, L., Conn, L. A., Pinner, R. W. y Teutsch, S. (1998). Trends in infectious disease hospitalizations in the United States, 1980-1994. Arch Intern Med 158, 1923-1928.

Singh, N. (2001). Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. Clin Infect Dis 33, 1692-1696.

Small, J. M. y Mitchell, T. G. (1989). Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. Infect Immun 57, 3751-3756.

Sorrell, T. C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety gattii. Med Mycol 39, 155-168.

Specht, C. A., Nong, S., Dan, J. M., Lee, C. K. y Levitz, S. M. (2007). Contribution of glycosylation to T cell responses stimulated by recombinant *Cryptococcus neoformans* mannoprotein. J Infect Dis 196, 796-800.

St Leger, R. J., Screen, S. E. y Shams-Pirzadeh, B. (2000). Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. Appl Environ Microbiol 66, 320-324.

Staib, F., Thielke, C., Randhawa, H. S., Senska, M. y Kulins, G. (1972). Colonisation of dead plants by *Cryptococcus neoformans*. Zentralbl Bakteriol Orig A 222, 115-125.

Stano, P., Williams, V., Villani, M., Cymbalyuk, E. S., Qureshi, A., Huang, Y., Morace, G., Luberto, C., Tomlinson, S. y Del Poeta, M. (2009). App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2. J Immunol 182, 84-91.

Steen, B. R., Zuyderduyn, S., Toffaletti, D. L., Marra, M., Jones, S. J., Perfect, J. R. y Kronstad, J. (2003). *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. Eukaryot Cell 2, 1336-1349.

Steenbergen, J. N. y Casadevall, A. (2003). The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Microbes Infect 5, 667-675.

Steenbergen, J. N., Shuman, H. A. y Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 15245-15250.

Syme, R. M., Spurrell, J. C., Amankwah, E. K., Green, F. H. y Mody, C. H. (2002). Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fcgamma receptor II for presentation to T lymphocytes. Infect Immun 70, 5972-5981.

Taborda, C. P. y Casadevall, A. (2002). CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity* 16, 791-802.

Thomaz, L., Garcia-Rodas, R., Guimaraes, A. J., Taborda, C. P., Zaragoza, O. y Nosanchuk, J. D. (2013). *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence* 4, 139-146.

Todaro-Luck, F., Reiss, E., Cherniak, R. y Kaufman, L. (1989). Characterization of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan polysaccharide with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 57, 3882-3887.

Toffaletti, D. L., Rude, T. H., Johnston, S. A., Durack, D. T. y Perfect, J. R. (1993). Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol* 175, 1405-1411.

Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K. y Yokoo, S. (2000). Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 46, 1129-1135.

Tokiwa, G., Tyers, M., Volpe, T. y Futcher, B. (1994). Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature* 371, 342-345.

Trilles, L., Lazera Mdos, S., Wanke, B., Oliveira, R. V., Barbosa, G. G., Nishikawa, M. M., Morales, B. P. y Meyer, W. (2008). Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 455-462.

Tucker, S. C. y Casadevall, A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3165-3170.

Vaishnav, V. V., Bacon, B. E., O'Neill, M. y Cherniak, R. (1998). Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydr Res* 306, 315-330.

van de Moer, A., Salhi, S. L., Cherniak, R., Pau, B., Garrigues, M. L. y Bastide, J. M. (1990). An anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody directed against galactoxylomannan. *Res Immunol* 141, 33-42.

Varma, A. y Kwon-Chung, K. J. (1994). Formation of a minichromosome in *Cryptococcus neoformans* as a result of electroporative transformation. *Curr Genet* 26, 54-61.

Vartivarian, S. E., Anaissie, E. J., Cowart, R. E., Sprigg, H. A., Tingler, M. J. y Jacobson, E. S. (1993). Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* 167, 186-190.

Vecchiarelli, A. (2000a). Cytokines and costimulatory molecules: positive and negative regulation of the immune response to *Cryptococcus neoformans*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48, 465-472.

Vecchiarelli, A. (2000b). Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 38, 407-417.

Vecchiarelli, A. (2007). Fungal capsular polysaccharide and T-cell suppression: the hidden nature of poor immunogenicity. *Crit Rev Immunol* 27, 547-557.

- Vecchiarelli, A., Dottorini, M., Pietrella, D., Monari, C., Retini, C., Todisco, T. y Bistoni, F. (1994). Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 130-137.
- Vecchiarelli, A., Pericolini, E., Gabrielli, E., Chow, S. K., Bistoni, F., Cenci, E. y Casadevall, A. (2011). *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. *Immunotherapy* 3, 997-1005.
- Vidotto, V., Sinicco, A., Di Fraia, D., Cardaropoli, S., Aoki, S. y Ito-Kuwa, S. (1996). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 136, 119-123.
- Villena, S. N., Pinheiro, R. O., Pinheiro, C. S., Nunes, M. P., Takiya, C. M., DosReis, G. A., Previato, J. O., Mendonca-Previato, L. y Freire-de-Lima, C. G. (2008). Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell Microbiol* 10, 1274-1285.
- Virtudazo, E. V., Kawamoto, S., Ohkusu, M., Aoki, S., Sipiczki, M. y Takeo, K. (2010). The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression, but plays important roles in the proper commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. *FEMS Yeast Res* 10, 605-618.
- Voelz, K., Johnston, S. A. y May, R. C. (2011). Intracellular replication and exit strategies, In *Cryptococcus. From human pathogen to model yeast*, T. R. K. Joseph Heitman, Kyung J Kwon-Chung, John R Perferct, and Arturo Casadevall, ed. (Washington: ASM), pp. 441-451.
- Voelz, K., Johnston, S. A., Rutherford, J. C. y May, R. C. (2010). Automated analysis of cryptococcal macrophage parasitism using GFP-tagged cryptococci. *PLoS One* 5, e15968.
- Voelz, K., Lammas, D. A. y May, R. C. (2009). Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77, 3450-3457.
- Walenkamp, A. M., Chaka, W. S., Verheul, A. F., Vaishnav, V. V., Cherniak, R., Coenjaerts, F. E. y Hoepelman, I. M. (1999). *Cryptococcus neoformans* and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26, 309-318.
- Walton, F. J., Idnurm, A. y Heitman, J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 57, 1381-1396.
- Wang, X., Rocheleau, T. A., Fuchs, J. F. y Christensen, B. M. (2006). Beta 1, 3-glucan recognition protein from the mosquito, *Armigeres subalbatus*, is involved in the recognition of distinct types of bacteria in innate immune responses. *Cell Microbiol* 8, 1581-1590.
- Wang, Y., Aisen, P. y Casadevall, A. (1995). *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun* 63, 3131-3136.
- Wang, Y. y Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* 60, 3864-3866.

- Warnock, D. W. (2007). Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48, 1-12.
- Warpeha, K. M., Park, Y. D. y Williamson, P. R. (2013). Susceptibility of Intact Germinating *Arabidopsis thaliana* to the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus*. *Appl Environ Microbiol*.
- Williamson, J. D., Silverman, J. F., Mallak, C. T. y Christie, J. D. (1996). Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*: a report of five cases. *Acta Cytol* 40, 363-370.
- Williamson, P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 176, 656-664.
- Williamson, P. R. (1997). Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci* 2, e99-107.
- Wozniak, K. L., Hardison, S. E., Kolls, J. K. y Wormley, F. L. (2011). Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. *PLoS One* 6, e17204.
- Xu, J., Luo, G., Vilgalys, R. J., Brandt, M. E. y Mitchell, T. G. (2002). Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. *Microbiology* 148, 203-212.
- Xue, C., Tada, Y., Dong, X. y Heitman, J. (2007). The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* 1, 263-273.
- Yauch, L. E., Lam, J. S. y Levitz, S. M. (2006). Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog* 2, e120.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. y Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 271, 13854-13860.
- Yu, X. Q. y Kanost, M. R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 275, 37373-37381.
- Yu, X. Q. y Kanost, M. R. (2002). Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *Eur J Biochem* 269, 1827-1834.
- Yuan, R. R., Spira, G., Oh, J., Paizi, M., Casadevall, A. y Scharff, M. D. (1998). Isotype switching increases efficacy of antibody protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Infect Immun* 66, 1057-1062.
- Zaragoza, O. (2011). Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol* 2, 181.
- Zaragoza, O. y Casadevall, A. (2004). Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* 6, 10-15.
- Zaragoza, O. y Casadevall, A. (2006). Monoclonal antibodies can affect complement deposition on the capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* by both classical pathway activation and steric hindrance. *Cell Microbiol* 8, 1862-1876.

Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L. y Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* 10, 2043-2057.

Zaragoza, O., Fries, B. C. y Casadevall, A. (2003a). Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun* 71, 6155-6164.

Zaragoza, O., Garcia-Rodas, R., Nosanchuk, J. D., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L. y Casadevall, A. (2010). Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog* 6, e1000945.

Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E. y Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68, 133-216.

Zaragoza, O., Taborda, C. P. y Casadevall, A. (2003b). The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol* 33, 1957-1967.

Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R. A., Dadachova, E. y Casadevall, A. (2006). The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* 59, 67-83.

Zhang, S., Hacham, M., Panepinto, J., Hu, G., Shin, S., Zhu, X. y Williamson, P. R. (2006). The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 62, 1090-1101.

Zhang, Y., Wang, F., Tompkins, K. C., McNamara, A., Jain, A. V., Moore, B. B., Toews, G. B., Huffnagle, G. B. y Olszewski, M. A. (2009). Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol* 175, 2489-2500.

Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. y Williamson, P. R. (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* 69, 5589-5596.

Zhu, X. y Williamson, P. R. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 5, 1-10.

Zinzalla, V., Graziola, M., Mastriani, A., Vanoni, M. y Alberghina, L. (2007). Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 63, 1482-1494.